

**Universidad Autónoma de Madrid.**  
**Facultad de Ciencias.**  
**Departamento de Biología Molecular.**



**“Caracterización funcional de las  
eIF2alfa quinasas de  
*Schizosaccharomyces pombe* en distintas  
situaciones de estrés”**

**Memoria presentada por**  
**Ruth Martín Martín**  
**para optar al grado de Doctor en Ciencias.**

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular  
“Severo Ochoa” bajo la dirección de los Doctores Juan José Berlanga  
Chiquero y César de Haro Castilla.



## Agradecimientos

---

### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer al Doctor César de Haro, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio, por su ayuda, sus consejos y su orientación durante estos años. Gracias por tu disponibilidad y por tu cercanía y también por tus palabras de ánimo.

A Juanjo, por la oportunidad de hacer la tesis contigo, por tu apoyo y tu cercanía. Gracias por ser mucho más que un “jefe”, por enseñarme, con toda la paciencia del mundo, no solo a “hacer” ciencia, sino también a disfrutar de la ciencia. Por tu amistad y por tu cariño, por las risas y buenos momentos, por tener siempre una palabra de ánimo cuando la he necesitado, muchas muchas gracias.

A Javi, por ser mi “hermanito en la ciencia” y no solo un compañero de trabajo, sino uno de mis mejores amigos. Por las palabras de ánimo y porque siempre que te he necesitado has estado ahí. Por las risas: en el laboratorio (siempre recordaré nuestros TAPs, nuestros primeros días en cultivos y nuestras inolvidables macedonias!!!!), o fuera de él (fiestas de disfraces, navideñas, congresos, celebraciones de tesis...). Por nuestras historias, imposibles de imaginar, y nuestras bromas, que nadie más comprende. Por enseñarme tantas cosas, por tu perseverancia. Por tus abrazos, nuestras horas de la comida, por todo!. Gracias Javi, una de las mejores cosas que me llevo de esta experiencia es tu amistad.

A Isa, por tu amistad desde que entré al labo, tu apoyo y los buenos momentos que pasamos! Por los cafés, por tu ayuda y tus consejos. Vas a ser toda una madraza!

A Jose, por tu ayuda experimental y también por tus consejos sobre la vida en general, por esos buenos momentos que he pasado contigo y por lo que nos hemos reído juntos, sobre todo en esta última etapa de mi tesis.

A toda la gente que ha pasado por éste, nuestro laboratorio, el 106! Atocha, por tu amistad y cariño. A MariPaz por tu ayuda experimental y por demostrarme que con ganas se puede hacer cualquier cosa. A Lucía por los buenos ratos que pasamos y por tu ayuda y amistad, ánimo con esa tesis!. A los chicos: José Luis, Miguel y Juan Manuel, por las risas de los últimos tiempos.

A Grego, porque siempre tienes una palabra amable para “tus chicos”, por preocuparte tanto por nosotros siempre.

Al 103, mi segundo laboratorio!! A Miguel Ángel, por tus consejos, tu ayuda con la genética, con los métodos y todo lo relacionado con *S. pombe*, por prestarme las cepas que he necesitado y por tu amabilidad y optimismo. A Marina, querida, que bien lo he pasado contigo! Por los cafés, las horas de spinning, nuestros momentos sauna, por prestarme tu hombro para apoyarme cuando lo he necesitado y tu oído para escucharme, por las visitas que ha habido y que quedan por hacer, por ser tan buena amiga. A Charo, a Hendri y a María, por los buenos momentos y por los que no lo fueron tanto, por esos congresos, lo que nos reímos con la valla!, por los consejos y por todo lo demás. A Ana y a Jael, por vuestra alegría! Y como no, por enseñarme lo que es la salsa!. Y al resto del 103, por sus reactivos, porque siempre me han tratado como a una más y por su microscopio.

Al labo 125, mis minis!! Que grandes amigos he hecho en este centro: A Raquel, por los buenos y malos momentos, de todos ellos hemos aprendido, y por todo tu apoyo. A Yesenia, gracias,

## Agradecimientos

---

por tu tesón, por tu amor por este trabajo!. Chicas, por vuestra amistad, por los mojitos de los jueves y por las risas. A Álvaro, ánimo, ya queda menos, serás todo un padrazo!.

Al “cónclave del mal”: Yuri, Dani, Frida, Anita, Bricio, Jara y Dani2. Que buenos momentos hemos pasado! Por las maldades que hemos compartido, y porque sean muchas más. Esas cenitas, cañitas y cafeses, las visitas de Yuri a la “tierra de los pinchos”, los piropos de Dani, la alegría de Frida, los ánimos de Ana, esas visitas de nuestro bibliotecario más dicharachero (Bricio), etc.

A María, “la de Murcia”, por tu cariño, tu alegría y tus ganas de hacer mil cosas, por esas fiestecillas, la visita a mi casa, la visita a la tuya...Por las ganas que le pones a la vida.

A los servicios del CBM, principalmente a cocinas, citometría de flujo y a las chicas de microscopía óptica, cuanto os he mareado!!.

A todos los amigos que tengo en mi tierra, Ávila; Rizos, Jaime, Quique, Sonso, Inma, Victor...muchas gracias por animarme tanto en este camino, por decirme siempre que yo podía con esto y con más...y muy especialmente a Vane, mi amiga desde que éramos niñas, que siempre me ha apoyado y con la que he compartido mil y una historias: el cole, el insti, el parque, la uni, nuestras fiestas y últimamente hasta su boda! Siempre has estado ahí, gracias.

A mis amigos de la uni, Esther, Sara, Vir y Juan; juntos aprendimos lo que era realmente esto de la Biología, esas prácticas en el labo y esas salidas nocturnas que nunca olvidaré. Por haber sido para mí como una pequeña familia.

A mis compis de piso de mi época madrileña: Ricardo2 y Fede. Muchas gracias por ser mis amigos, por vuestro apoyo, por las cervezas en el irlandés y las charlas trascendentales sobre la vida.

A mi familia. A mis tíos, Trini y Martín, lo que me ayudasteis cuando vivía en Salamanca! Muchas gracias por vuestro apoyo. A Inma y a Nardi, por su cariño. A Fernando y Mercedes, por acogerme en vuestra casa. A mis primos, por todo: Jordi, Nacho, Sara, Judi, Rubén, Noe, Álvaro y Alberto. A mis amigas de Flores: Isa, Cris, Gemma, Sara y Judi, por las risas y las historias!.

A mis padres. Nunca habría conseguido llegar hasta aquí sin vuestra ayuda. Por vuestro apoyo, siempre, aunque pensaseis que estaba equivocada. Por demostrarme que con esfuerzo todo se consigue, que las cosas hay que hacerlas bien y no rápido. Por vuestro apoyo, vuestro cariño, vuestra constancia y buen hacer. Por transmitirme la importancia de estudiar y de hacer algo que me guste, por enseñarme que las cosas se consiguen con perseverancia. Ascen, Juan, cuanto he aprendido de vosotros!. Gracias por quererme tanto.

A mi hermanita Lorena, por decir siempre lo que piensas, por quererme y apoyarme, por tu cariño. Cuantos años de convivencia, de confidencias y de cotilleos. Por todo lo que me haces reír con tus historias! Cuanto te echaba de menos cuando me mudé a Madrid!

A Ricardo, por estos 15 años, por quererme y cuidarme tanto. Por enseñarme tantas cosas sobre la vida. Por demostrarme que si quiero hacer algo, tengo que intentarlo y dejar de temer al fracaso. Porque por ti soy como soy, por enseñarme a querer y tantas otras cosas, hasta a montar en bici!!. Por ser tan constante y enseñarme que yo también puedo serlo. Sin tu apoyo no habría llegado hasta aquí. Por cuidarme cuando llego a casa tan cansada, por ayudarme en todo y con todo. Te quiero.

**GRACIAS.**



***“Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”.***

***A mis padres, Ascen y Juan; y a mi hermana Lorena.***

***A Ricardo.***



# Índice

Abreviaturas.....	I
-------------------	---

Resumen en inglés (Summary) .....	II
-----------------------------------	----

Introducción .....	1
--------------------	---

1 La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	1
2 Iniciación de la traducción. ....	2
2.1 El factor eIF2. ....	4
2.2 Regulación de la traducción por la fosforilación del eIF2alfa.....	5
2.3 Las eIF2alfa quinasas.....	6
2.3.1 eIF2alfa quinasas de mamíferos. ....	7
2.3.2 eIF2 alfa quinasas en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2.3.3 eIF2alfa quinasas en la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . ....	11
3 Las MAP quinasas (MAPK) en <i>S. pombe</i> . ....	13
3.1 Ruta de integridad celular. ....	14
3.2 Ruta de respuesta a feromonas.....	15
3.3 Ruta de respuesta a estrés. ....	16
4 El ciclo celular de <i>S. pombe</i> . ....	20
4.1 Papel de Sty1 en la regulación del ciclo celular de <i>S. pombe</i> . ....	23
4.2 Papel de las eIF2alfa quinasas en la regulación del ciclo celular de <i>S. pombe</i> . ....	24

Objetivos .....	27
-----------------	----

Materiales y Métodos.....	28
---------------------------	----

Materiales .....	28
1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	28
2 Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	28
3 Medios de cultivo. ....	29
4 Anticuerpos. ....	30

5	Productos químicos.....	30
	Métodos .....	31
1	Métodos de cultivo y transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	31
2	Métodos de cultivo de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	31
3	Manipulación de ácidos nucleicos.....	32
3.1	Electroforesis de ácidos nucleicos. ....	32
3.2	Transformación de células de <i>S. pombe</i> .....	32
3.3	Extracción de ADN genómico de células de <i>S. pombe</i> .....	32
3.4	Reacción en cadena de la polimerasa. ....	32
3.5	Extracción de ARN total de células de <i>S. pombe</i> .....	33
3.6	PCR con transcriptasa reversa. ....	33
3.7	PCR en tiempo real .....	33
4	Técnicas genéticas.....	34
5	Ensayos de estrés celular.....	35
5.1	Estrés oxidativo.....	35
5.2	Estrés por daño en el ADN. ....	35
5.3	Estrés térmico. ....	35
5.4	Estrés por ausencia de glucosa.....	35
5.5	Estrés por ausencia de nitrógeno. ....	36
5.6	Estrés causado por el gasto de nutrientes en el medio de cultivo .....	36
6	Ensayos de viabilidad en placa.....	36
6.1	Estrés oxidativo en placa. ....	36
6.2	Estrés por daño en el ADN en placa. ....	36
6.3	Estrés térmico en placa. ....	37
6.4	Estrés por ausencia de glucosa en placa. ....	37
7	Recuento de células para estimar el porcentaje de apareamiento. ....	37
8	Análisis de proteínas. ....	37
8.1	Obtención de extractos proteicos de <i>S. pombe</i> . ....	37
8.2	Electroforesis de proteínas.....	38
8.3	<i>Western Blot</i> .....	38
8.4	Métodos de cuantificación por densitometría. ....	38
8.5	Inmunoprecipitación. ....	39
8.6	Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .....	39

9	Técnicas de citometría de flujo. ....	39
10	Técnicas de microscopía. ....	40

## Resultados..... 41

1	Estudio de la activación diferencial de las eIF2alfa quinasas de <i>S. pombe</i> en respuesta al estrés y su regulación por la MAPK (SAPK) Sty1. ....	41
1.1	Respuesta a estrés oxidativo. ....	41
1.2	Respuesta a la exposición al agente genotóxico MMS. ....	44
1.3	Respuesta al choque térmico a 40°C. ....	46
1.4	Respuesta al choque térmico a 48°C. ....	49
1.5	Respuesta al gasto de nutrientes en el medio de cultivo. ....	50
1.6	Respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio. ....	53
1.6.1	Respuesta a la ausencia de glucosa. ....	53
1.6.2	Respuesta a la ausencia de nitrógeno. ....	54
1.7	Regulación de la expresión génica de las eIF2alfa quinasas durante el estrés oxidativo y el choque térmico. ....	57
2	Implicación de las eIF2alfa quinasas en la modulación del ciclo celular de <i>S. pombe</i> en situaciones de privación de nitrógeno. ....	60
2.1	Estudio de la parada del ciclo celular en la fase G1. ....	60
2.2	Estudio de la cinética de crecimiento de <i>S. pombe</i> . ....	62
2.3	Estudio del efecto de la fosforilación del factor eIF2 en la parada del ciclo celular en la fase G1. ....	63
2.4	Estudio del efecto de la fosforilación del factor eIF2 en la diferenciación sexual. ....	66
3	Implicación de las eIF2alfa quinasas en la capacidad de supervivencia de las células de <i>S. pombe</i> en respuesta a diferentes situaciones de estrés. ....	67
3.1	Estrés oxidativo. ....	67
3.2	Estrés genotóxico por la presencia de MMS. ....	68
3.3	Estrés por deficiencia de glucosa en el medio de cultivo. ....	69
3.4	Implicación de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular en situaciones de estrés oxidativo y de baja glucosa. ....	70
3.5	Papel de las eIF2alfa quinasas y de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular de <i>S. pombe</i> en condiciones de estrés térmico a 40°C. ....	71

Discusión.....	73
1 Caracterización funcional de las eIF2alfa quinasas de <i>S. pombe</i> y su relación con la ruta de señalización de la MAPK Sty1.....	74
1.1 Estrés oxidativo.....	74
1.2 Estrés genotóxico.....	76
1.3 Estrés térmico. ....	76
1.4 Entrada en la fase estacionaria.....	78
1.5 Ausencia de nutrientes.....	79
1.5.1 Ausencia de glucosa.....	79
1.5.2 Ausencia de nitrógeno.....	79
1.6 Regulación de la expresión de las eIF2alfa quinasas durante el estrés oxidativo y el choque térmico.....	81
2 Implicación de la actividad eIF2alfa quinasa en la modulación del ciclo celular de <i>S. pombe</i> en situaciones de privación de nitrógeno.....	82
2.1 Papel modulador de las eIF2alfa quinasas y de la fosforilación del factor eIF2 en la parada en G1 originada por la ausencia de nitrógeno.....	82
2.2 Papel de la fosforilación del factor eIF2 en la diferenciación sexual.....	85
3 Papel de Gcn2 y de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular en diferentes situaciones de estrés.....	86
Resumen general y perspectivas.....	87
 Conclusiones .....	 89
 Bibliografía .....	 90

## Anexo:

“Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Sty1 in Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinases in Response to Environmental Stress in *Schizosaccharomyces pombe*.”







### **ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
AMP	Adenosina monofosfato.
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico.
APC	Complejo promotor de anafase (Anaphase Promoting Complex).
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNr	ARN ribosomal.
ARNt	ARN de transferencia.
ATF	Factor activador transcripcional (Activating transcriptional factor).
ATP	Adenosina trifosfato.
BiP	Proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulinas (Immunoglobulin heavy-chain binding protein).
BSA	Seroalbúmina bovina.
Cdc	“Cell division control”.
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina.
CESR	Respuesta esencial a estrés ambiental (core environmental stress response).
CHOP	“C/EBP homologous protein”.
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
D.O.	Densidad óptica.
dsRNA	ARN de doble banda.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetraacético.

## *Abreviaturas*

---

eIF	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eukaryotic initiation factor).
EMM	Medio mínimo de crecimiento (Edinburg minimal media).
E.R.	Retículo endoplasmático (endoplasmic reticulum).
GAP	Proteína activadora de GTPasas (GTPase activating protein).
GCN	“General control non-derepressible”.
GDP	Guanosina difosfato.
GSK3	Glicógeno sintasa quinasa 3 (Glycogen synthase kinase 3).
GTP	Guanosina trifosfato.
HMG	Grupo de alta movilidad (High mobility group)
HRI	Inhibidor regulado por hemina (Hemin regulated inhibitor).
kDa	KiloDalton.
LB	“Luria-Bertani media”.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (Mitogen activated protein kinase).
MAPKAP	Proteína quinasa activada por MAPK (MAP kinase-activated protein kinase).
MAPKK	MAPK quinasa.
MAPKKK	MAPKK quinasa.
MEA	“Malt extract Agar”.
Met-tRNA <sub>i</sub>	Metionil ARNt iniciador.
MFC	Complejo multifactorial.
ORF	Marco de lectura abierto (Open Reading frame).
PABP	“Poly-A binding protein”.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG	Polietilen glicol.
PERK	“Pancreatic ER resident kinase” o “PKR like ER kinase”.
PKR	Proteína quinasa regulada por ARN de doble banda.

## Abreviaturas

---

PP2C	Proteína fosfatasa 2C.
Pyp	Proteína tirosin fosfatasa que regula negativamente a Sty1.
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species).
RT-PCR	PCR de transcripción reversa.
SAPK	Proteína quinasa activada por estrés (stress activated protein kinase).
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS.
SPB	Cuerpo polar del huso (spindle pole body).
Sty1	MAPK de <i>S. pombe</i> .
TAE	Tris-acetato EDTA.
TBS	Tampón Tris salino.
TEMED	N, N, N', N', -tetrametileteendiamina.
TOR	Diana de rapamicina (target of rapamycin).
TORC	Complejo TOR (TOR complex).
WT	Cepa Silvestre (Wild-type).
YES	Medio completo de crecimiento para <i>S. pombe</i> (Yeast extract plus supplements).



### RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

Reversible phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) by eIF2alpha kinases under stress conditions plays a fundamental role in regulating protein synthesis in eukaryotic cells. In *Schizosaccharomyces pombe*, three kinases phosphorylate eIF2alpha at the serine fifty two under environmental stress situations: Gcn2, Hri1 and Hri2. Our results reveal that each eIF2alpha kinase is involved in the response to different stress conditions. Thus, Gcn2 participates in the response to oxidative stress, nitrogen starvation or exposure to genotoxic stress produced by MMS. However, Hri2 is involved in the response to heat shock and low glucose conditions, while Hri1 is activated under nitrogen and glucose starvation. Moreover, the expression of the three eIF2alpha kinases is modified as a consequence of the application of several stress conditions such as oxidative stress and heat shock.

Because the most important response under environmental stress situations is regulated by the MAPK Sty1, we studied the relationship between this pathway and the eIF2alpha kinases pathway. We discovered that Sty1 negatively regulates eIF2alpha kinases activity under oxidative stress and nitrogen starvation, but not under other stress conditions such as heat shock or genotoxic stress.

Under nitrogen starvation, fission yeast cells promote the exit from the vegetative cell cycle in G1 phase to initiate sexual differentiation and to produce spores, in order to survive to this stress condition. According to the results presented here, the activity of Gcn2 and the phosphorylation of eIF2alpha seem to be required to arrest the cell cycle on time upon nitrogen starvation. Our results also show that eIF2alpha phosphorylation must be important in processes leading to sexual differentiation and sporulation. Under nitrogen starvation, we have studied a possible relationship between Tor1 pathway, MAPK Sty1 and eIF2alpha kinases pathway, and we found that Gcn2 seems to be essential for Sty1 activation.

Finally, in this work we have also demonstrated that Gcn2 and eIF2alpha fosforilation have an important role in cell survival under different stress conditions, such as oxidative stress, heat shock or low glucose. Thus, the stress response pathway involving the eIF2alpha kinases participates in important processes that allow cells to increase the possibilities of survival.



## **Introducción**

***“A la manera que el río hace sus propias riberas, así toda idea legítima hace sus propios caminos y conductos”.***

***Ralph Waldo Emerson.***





### 1. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

*S. pombe* es un organismo eucariótico unicelular que pertenece al reino Fungi, división *Ascomycota*, orden *Saccharomyces* y al género *Schizo*. El género *Schizosaccharomyces* engloba un pequeño grupo de levaduras que comparten la característica de dividirse por fisión.

Esta levadura presenta forma de bacilo o bastón, crece por extensión apical y se divide por la formación de un septo en la parte media de la célula. Cuando la cantidad de azúcar es elevada, produce fermentación alcohólica puesto que su metabolismo es respiro-fermentativo.

Dicho organismo es generalmente haploide con dos sexos conocidos,  $h^+$  y  $h^-$ , y además, esta levadura es homotática, es decir, puede cambiar de sexo cada dos generaciones pero las cepas que se utilizan en el laboratorio han sido mutadas de forma que han perdido esta capacidad (Nasim *et al*, 1989; Mitchison *et al*, 1990; Moreno *et al*, 1991; Egel, 2000; Egel, 2004). En condiciones de privación de nutrientes, las células se aparean y forman cigotos diploides que se dividen por meiosis dando lugar a un asca con cuatro ascosporas.

El material genético de *S. pombe* está organizado en tres cromosomas y 4824 genes que codifican proteínas; y está completamente secuenciado facilitando un rápido estudio genético (Wood *et al*, 2002). Muchos de sus genes están altamente conservados en todas las células eucarióticas, incluidas las células humanas.

Esta levadura se aisló por primera vez a partir de la cerveza de mijo en el año 1890, Linder fue el primero en describirla en 1893 y escogió el término “pombe” (cerveza en Swahili) para denominarla (Linder, 1893; Forsburg Lab pombe Pages: *S. pombe* history, [www-rcf.usc.edu](http://www-rcf.usc.edu)).

Linder aisló una cepa haploide homotática capaz de aparear formando tétradas con cuatro ascosporas, pero fue Urs Leupold en 1950 quien aisló las cepas de levadura que actualmente se utilizan en el laboratorio: la cepa 968 homotática  $h^{90}$ , la cepa  $h^-$  972 y la cepa  $h^+$  975 (Leupold, 1950).

Tras analizar las secuencias de ADN de esta levadura y compararlas con las de *S. cerevisiae* y las de *Homo sapiens*, se ha observado que existen algunos genes conservados en *S. pombe* y en células humanas que en *S. cerevisiae* se han perdido (Bähler, 1998).

Las levaduras se encuentran en la naturaleza en una amplia variedad de hábitats, donde están sometidas a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes, variaciones de pH, cambios de temperatura, exposición a los rayos ultravioleta, variaciones en la

osmolaridad, etc. En respuesta a estas situaciones de estrés se activan una serie de rutas de señalización para asegurar la supervivencia.

## 2. Iniciación de la traducción.

En las células eucariotas la síntesis de proteínas es el último paso en el proceso de la expresión génica y está altamente regulada. Dicho proceso consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Aunque todas ellas presentan puntos de regulación, la traducción está principalmente controlada en la etapa de iniciación.

La iniciación es el proceso por el cual el ribosoma se acopla al ARN transferente (ARNt) iniciador y al ARN mensajero (ARNm) para comenzar la síntesis de la cadena polipeptídica. Los factores de iniciación eucarióticos interaccionan entre sí para catalizar los diferentes pasos del proceso de iniciación, actuando como puntos de regulación (Dever, 2002).

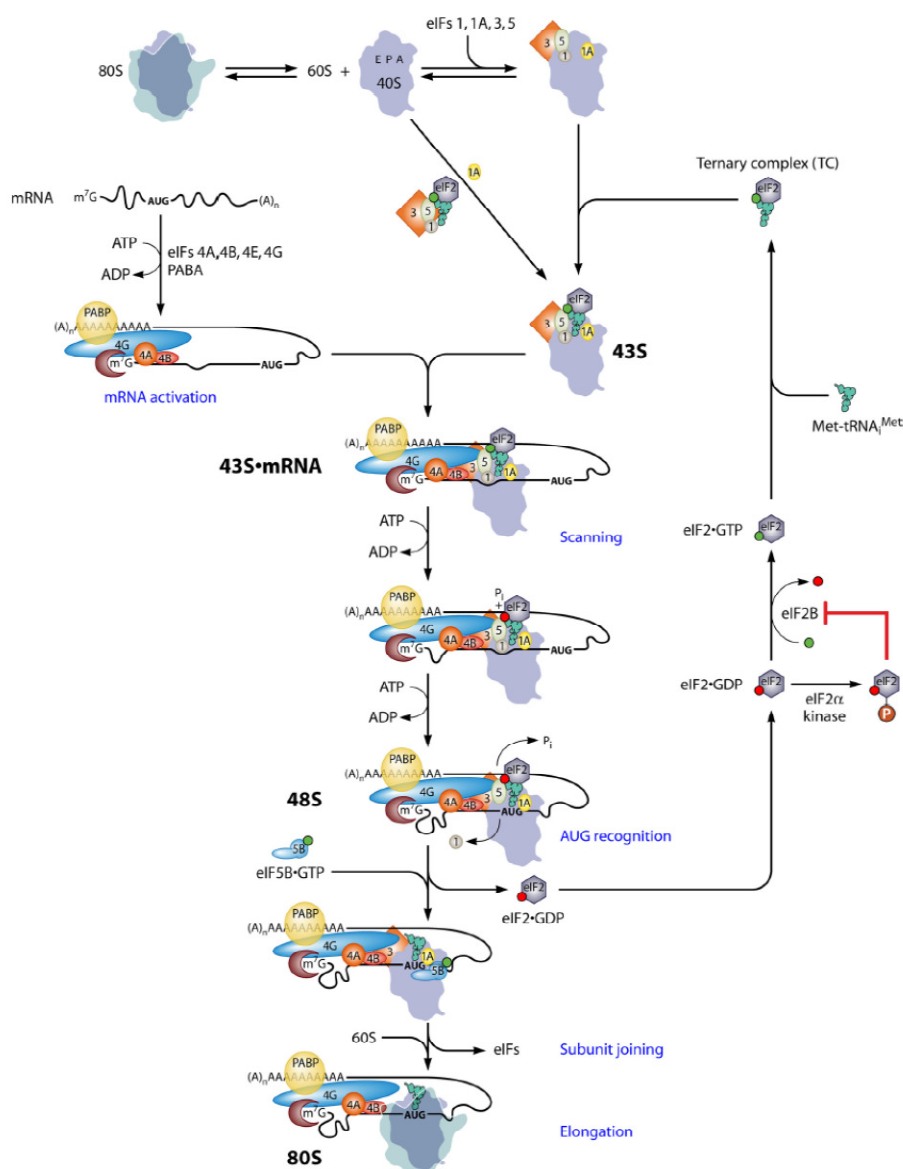
Los ribosomas constan de una subunidad grande y de otra pequeña que se sintetizan en el nucléolo, se transportan como entidades separadas hasta el citosol y, allí, se unen formando un ribosoma funcional cuando se inicia la síntesis de proteínas (Devlin, 2002). En eucariotas, la subunidad pequeña tiene un coeficiente de sedimentación de 40S y está formada por 33 proteínas y un ARNr 18S (Beckmann *et al*, 2001). La subunidad grande tiene un coeficiente de sedimentación de 60S y consta de 50 proteínas y 3 ARNr de 28S, 5.8S y 5S, respectivamente (Beckmann *et al*, 2001). Esta subunidad cataliza la formación de enlaces peptídicos (Ban *et al*, 1998; Beckmann *et al*, 2001; Devlin, 2002).

El ARNt iniciador, también llamado metionil ARNt iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>), se asocia al factor eucariótico de iniciación eIF2 una vez éste se ha unido a una molécula de GTP para formar el complejo ternario. El metionil ARNt iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>) se une a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo de pre-iniciación 43S, los factores eIF1, eIF1A, eIF5 y eIF3 también se asocian estimulando la formación de dicho complejo (Figura 1). En levaduras, el complejo ternario interacciona con los factores eIF1, eIF3 y eIF5 para formar el complejo multifactorial (MFC) (Asano *et al*, 2000), tras estas interacciones, se forma el complejo 43S que ya es estable (Hinnebusch *et al*, 2007).

El complejo de pre-iniciación 43S se une al ARNm en una reacción que está promovida por los factores que se asocian al ARNm, conocidos genéricamente como eIF4, y la proteína de unión a poli-(A) (PABP); destaca el papel del complejo eIF4F, formado por: eIF4E, que se unirá a la estructura Cap, eIF4G y la ARN helicasa eIF4A (Hinnebusch, 2011). Además del complejo eIF4F, en este paso, también intervienen los

## Introducción

factores eIF4B y eIF4H (Dever, 2002). El complejo eIF4F se asocia con el eIF3 unido al complejo 43S y, juntos, se unen a la estructura Cap de ARNm a través del eIF4E, para formar el complejo 48S (Gingras *et al*, 1999; Raught *et al*, 2000, Prévôt *et al*, 2003). El factor eIF4G se asocia a los factores eIF4E y eIF4A y a la proteína PABP promoviendo el ensamblaje de la subunidad 43S con la estructura Cap del ARNm y dando como resultado un ARNm circular (Figura1) (Gallie, 1998; Prévôt *et al*, 2003).



**Figura 1. Esquema general de la iniciación de la traducción.** La iniciación de la traducción comienza con la disociación del ribosoma en sus dos subunidades: 40S y 60S. Posteriormente se produce el ensamblaje del complejo de pre-iniciación 43S en la subunidad pequeña del que forma parte el complejo ternario eIF2, GTP y Met-tRNA<sub>i</sub>. Por otro lado, tiene lugar la activación del ARNm por la unión del complejo eIF4F, una vez activado, el ARNm se une al complejo 43S formando el complejo 48S. En este punto, se produce el reconocimiento del AUG que se empareja con el Met-tRNA<sub>i</sub> y la hidrólisis de GTP, después se produce el ensamblaje de la subunidad 60S dando lugar al complejo 80S y al comienzo de la elongación. (Hinnebusch, 2011).

El complejo de pre-iniciación 48S rastrea el ARNm para conseguir el apareamiento entre el codón de iniciación AUG y el anticodón del metionil ARNt iniciador, este apareamiento tiene lugar cuando el codón AUG entra en el sitio P de la subunidad 40S del ribosoma (Hinnebusch, 2011). Para que el complejo de pre-iniciación 48S sea estable, se produce la hidrólisis de la molécula de GTP que se encuentra formando parte del complejo ternario unida al factor eIF2, esta hidrólisis es dependiente de la proteína GAP (GTPase-activating protein) eIF5 (Hinnebusch *et al*, 2007; Pestova *et al*, 2007). Posteriormente, se produce la liberación del complejo eIF2-GDP y de eIF3, el factor eIF5B cataliza la unión de la subunidad 60S del ribosoma al complejo 48S dando lugar al complejo 80S (Figura 1) (Dohlman y Thorner, 1997; Asano *et al*, 2000; Paulin *et al*, 2001; Dever, 2002). Este complejo contiene el metionil ARNt iniciador ya emparejado con el AUG en el sitio P de la subunidad 40S del ribosoma preparado para comenzar la fase de elongación de la síntesis proteica (Hinnebusch *et al*, 2007; Pestova *et al*, 2007).

### 2.1. El factor eIF2.

El factor eIF2 es el encargado de mediar la unión del Met-tRNA<sub>i</sub> al sitio P de la subunidad 40S del ribosoma de forma dependiente de GTP. También interviene en el reconocimiento del codón de iniciación (Alberts *et al*, 1994; Krishnamoorthy *et al*, 2001). Tras el reconocimiento del AUG iniciador, se produce la hidrólisis de GTP y la liberación del eIF2 unido a GDP. Posteriormente el eIF2 ha de ser reactivado, intercambiando GDP por GTP, por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina eIF2B para que pueda llevar a cabo una nueva ronda de iniciación de la traducción. El factor eIF2 consta de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (de Haro *et al*, 1996; Proud, 2005).

La subunidad  $\alpha$  representa la región reguladora y contiene una serina muy conservada en la posición 51 (52 en *Schizosaccharomyces pombe*), cuya fosforilación representa uno de los mecanismos más importantes de la represión global de la síntesis de proteínas (Hershey, 1991; Dever *et al*, 2002; Proud, 2005). Esta fosforilación tiene lugar por proteínas quinasa específicas denominadas eIF2alfa quinasas.

La subunidad  $\beta$  presenta tres grupos de lisina en su región amino terminal, región por la cual interacciona con el ARNm (Flynn *et al*, 1994; Laurino *et al*, 1999). También se une al ARNm mediante su región carboxilo terminal a través de una zona que contiene motivos de dedos de zinc (Hinnebusch, 2000). La región carboxilo terminal guarda gran semejanza estructural con el factor eIF5, lo que sugiere que esta zona podría ser la de interacción con el GTP (Asano *et al*, 1999). La región central de la subunidad  $\beta$  del factor eIF2 es la encargada de establecer la interacción con el Met-tRNA<sub>i</sub> (Thompson *et al*, 2000). Se cree que la misión de esta subunidad del factor eIF2

es impedir la hidrólisis del GTP del complejo ternario hasta que éste se una con el ARNm. Una vez tiene lugar la interacción entre el ARNm y la subunidad  $\beta$  de eIF2, esta subunidad dejará la molécula de GTP accesible para que pueda interaccionar con el factor eIF5 (Thompson *et al*, 2000).

La subunidad  $\gamma$  presenta dominios de unión a GTP en su región carboxilo terminal, aunque estudios en levaduras han demostrado que también puede unirse al Met-tRNA<sub>i</sub> (Hinnebusch, 2000; Gaspar *et al*, 1994). Constituye el centro GTPasa del complejo y se une a eIF5 para promover la hidrólisis del GTP, una vez se ha producido el reconocimiento del AUG iniciador y ha cesado el escaneo (Paulin *et al*, 2001).

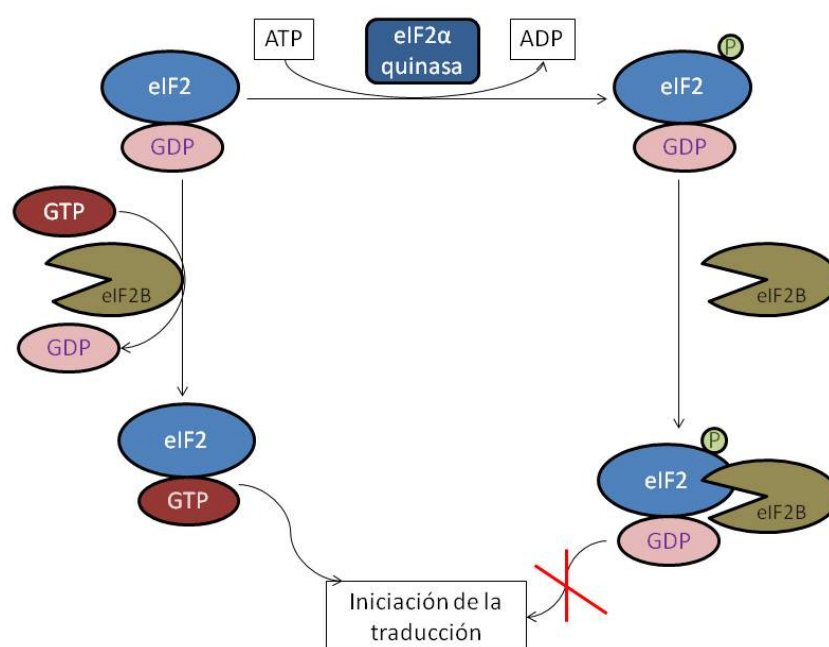
El factor eIF2B no interviene en la formación del complejo de iniciación de la traducción, sin embargo, es necesario para reactivar el eIF2 que se libera del ribosoma en forma de eIF2-GDP. Este factor actúa como intercambiador de nucleótidos de guanina e intercambia GDP por GTP (Rowlands *et al*, 1988).

### 2.2. Regulación de la traducción por la fosforilación del eIF2alfa.

La fosforilación reversible de la serina 51 de la subunidad alfa del factor eIF2 es uno de los mecanismos mejor caracterizado de regulación de la síntesis de proteínas, en respuesta a diferentes tipos de estrés. Esta fosforilación promueve la inhibición de la actividad intercambiadora de GTP por parte del eIF2B (Figura 2).

Cuando la subunidad alfa de eIF2 está fosforilada se une a la región reguladora del eIF2B de manera más estable, produciéndose una inhibición del intercambio de GDP por GTP (Krishnamoorthy *et al*, 2001; Dever, 2002). El eIF2 fosforilado tiene una afinidad por el eIF2B 150 veces superior a la del factor no fosforilado (Krishnamoorthy *et al*, 2001). Dado que el eIF2B es un factor limitante, la fosforilación de un pequeño número de moléculas de eIF2 es suficiente para secuestrar todo el eIF2B en forma de complejo inactivo eIF2 $\alpha$ P-GDP-eIF2B (Figura 2) (Rowlands *et al*, 1988; de Haro *et al*, 1996). Cuando esto ocurre, se produce una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas y un incremento de la traducción de ciertos mensajeros con características especiales en su región 5' no traducida, como los de GCN4 en levaduras y ATF4 en células de mamífero. Tanto GCN4 como ATF4 son factores de transcripción que activan la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés (Hinnebusch, 1997; Harding *et al*, 2000). El ARNm de GCN4 presenta cuatro fases de lectura abierta (uORF) en su región 3' no traducida. Los ribosomas se unen al 5' del ARNm de GCN4 y traducen la ORF1 tanto en condiciones normales como en situaciones de deficiencia de nutrientes. En ambas situaciones, la subunidad 40S del ribosoma permanece unida al ARNm y vuelve a rastrear la secuencia previa al AUG de las siguientes uORFs. Cuando los nutrientes son abundantes hay gran cantidad de complejo ternario disponible para

unirse a la subunidad 40S, facilitando que la mayoría de los ribosomas reinicien en las uORFs 2, 3 ó 4. Al terminar la traducción del polipéptido 4, los ribosomas se disocian del ARNm y se impide la iniciación en el AUG de GCN4, ya que la subunidad 40S del ribosoma difícilmente podría unirse de nuevo al complejo ternario antes de alcanzar el AUG iniciador. En situaciones en las que el eIF2 está fosforilado, la cantidad de complejo ternario disponible es mucho menor, por lo que los ribosomas traducen la uORF 1, pero no son capaces de reiniciar en la uORF 4, pudiendo comenzar la traducción cuando alcanzan el AUG iniciador de GCN4. Este mecanismo es muy similar al que opera en el mensajero de ATF4 (Harding, 2000). Sin embargo, el mensajero de ATF4 presenta únicamente dos uORFs, la segunda de las cuales solapa con la ORF de ATF4 aunque en distinta fase de lectura (Harding, 2000).



**Figura 2. Esquema del mecanismo de intercambio de GDP por GTP.** En situaciones estrés en las que las proteínas eIF2alfa quinasas fosforilan al factor eIF2 en su serina 51, el eIF2 fosforilado secuestra al factor eIF2B impidiendo que éste lleve a cabo el intercambio de GDP por GTP y promoviendo la inhibición de la síntesis de proteínas.

### 2.3. Las eIF2alfa quinasas.

Las eIF2alfa quinasas son las proteínas serina-treonina quinasas altamente específicas que fosforilan la serina 51 de la subunidad alfa del factor eIF2 (de Haro *et al*, 1996; Dever, 1999). Las eIF2alfa quinasas se autofosforilan como condición previa para su activación. Estas proteínas quinasa se caracterizan por tener un dominio catalítico conservado que consta de 12 subdominios (Hanks y Hunter, 1995) con un



inserto entre los subdominios IV y V de tamaño variable. Además, cada eIF2alfa quinasa cuenta con regiones reguladoras diferentes, de modo que cada una de ellas podrá responder de forma específica ante los diferentes tipos de estrés (de Haro *et al*, 1996).

Al igual que otras serina-treonina quinasas, contienen un residuo de lisina en el subdominio II de la región catalítica que es esencial para la actividad enzimática, puesto que ancla y orienta el ATP de forma correcta gracias a su interacción con los fosfatos alfa y beta (Hanks y Hunter, 1995).

En mamíferos se han identificado cuatro eIF2alfa quinasas diferentes capaces de responder a señales específicas de estrés. El producto del gen GCN2, la quinasa regulada por ARN de doble banda (PKR), la proteína pancreática asociada al retículo endoplasmático (PERK) y el inhibidor regulado por hemina (HRI). En otros organismos también se han caracterizado eIF2alfa quinasas que responden a diversos tipos de estrés. Así, en *Saccharomyces cerevisiae* se determinó la presencia de una única eIF2alfa quinasa conocida como GCN2 (*gcn2: general control nonderepressed 2*), que se activa cuando esta levadura se somete a privación de algún aminoácido o purina (Wek, 1994; Hinnebusch, 2000). En *Schizosaccharomyces pombe* existen tres eIF2alfa quinasas: el ortólogo de GCN2 de *S. cerevisiae*; y las proteínas Hri1 y Hri2, estructuralmente relacionadas entre sí y con la eIF2alfa quinasa HRI de células de mamífero. En *Drosophila melanogaster* sólo hay dos eIF2alfa quinasas, GCN2 y PERK (Santoyo *et al*, 1997; Pomar *et al*, 2003).

### 2.3.1. eIF2alfa quinasas de mamíferos.

**-GCN2:** Es el único miembro de la familia de eIF2alfa quinasas que está presente en todas las células eucarióticas. Se describió por primera vez en *S. cerevisiae* y tiene un peso molecular aproximado de 180 kDa (Santoyo *et al*, 1997; Sattlegger *et al*, 1998; Berlanga *et al*, 1999).

Se activa tanto en situaciones de escasez o privación de aminoácidos o suero, como por irradiación con luz ultravioleta (Berlanga *et al*, 1999; Hinnebusch, 2000; Harding *et al*, 2000; Deng *et al*, 2002). GCN2 también participa en la respuesta antiviral (Berlanga *et al*, 2006) y ha sido implicado en la respuesta inducida por proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico junto a PERK (Hamanaka *et al*, 2005; Hao *et al*, 2005; Maurin *et al*, 2005).

GCN2 está constituido por cinco regiones estructurales principales que están muy conservadas entre las diferentes especies: la región amino terminal, el dominio pseudoproteína quinasa, el dominio catalítico o dominio proteína quinasa, la región

relacionada con las histidil-ARNt sintetasas (HisRS) y la región de unión al ribosoma que se corresponde con el extremo carboxilo terminal (Figura 3). Para que GCN2 se active es necesaria la dimerización de la proteína quinasa a través de interacciones entre los dominios proteína quinasa y carboxilo terminal de los monómeros de GCN2 (Qiu *et al*, 1998; Narasimhan, 2004).

**-PKR:** La proteína quinasa regulada por ARN de doble banda tiene un peso molecular aproximado de 68 kDa. Su expresión se induce por interferón de tipo 1 y se activa por ARN de doble banda producido durante la infección viral (Kaufman, 2000). Consta de dos dominios: el dominio proteína quinasa que se encuentra en el extremo carboxilo terminal y el dominio regulador, situado en el extremo amino terminal (de Haro *et al*, 1996).

Se ha propuesto que los dos dominios de unión a ARN de doble banda se encuentran localizados en el extremo amino terminal, de modo que éste se pliega e interacciona con la región carboxilo terminal bloqueando el sitio de unión a ATP que se encuentra en el dominio proteína quinasa (Figura 3). Esta interacción actúa inhibiendo la autofosforilación de la quinasa y la fosforilación del sustrato eIF2alfa (Yang *et al*, 1995; Abraham *et al*, 1999).

En situaciones normales, existe un equilibrio entre la forma monomérica y la forma dimérica de PKR; cuando se produce una infección por virus la unión de ARN de doble banda a PKR modifica este equilibrio. Una vez se une el ARN de doble banda a PKR se produce un cambio conformacional, de modo que va a quedar expuesto el sitio de unión a ATP, hecho que induce la dimerización de las moléculas de PKR, desencadenando la autofosforilación de la proteína y la activación de ésta, que ya podría fosforilar a su sustrato (Kaufman, 2000; Cole, 2007; Lemaire *et al*, 2008). Ante una infección viral, se induce y se activa PKR, produciéndose la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas e induciendo la apoptosis celular (Kaufman, 2000; Proud, 2005). La fosforilación de eIF2alfa induce la muerte celular programada, inhibiendo la síntesis de productos anti-apoptóticos y permitiendo la traducción de ARNm de efectores pro-apoptóticos (Kaufman, 2000; Proud, 2005).

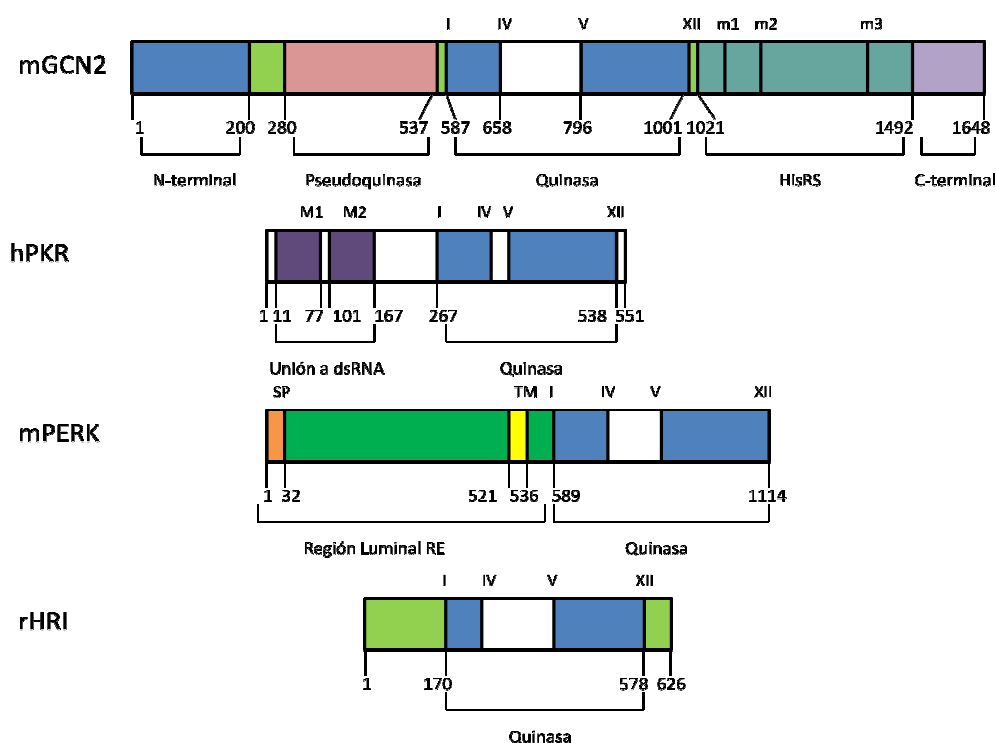
Se ha propuesto que PKR, GCN2 y PERK son capaces de activar al factor NF- $\kappa$ B a través de un mecanismo que promueve la fosforilación indirecta del factor I $\kappa$ B $\alpha$  (Zamanian-Daryoush *et al*, 2000; Ishii *et al*, 2001; Jiang *et al*, 2003; Deng *et al*, 2004; Gil *et al*, 2004).

**-PERK:** La proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico tiene un peso molecular aproximado de 131 kDa. Se identificó originariamente en células de páncreas, donde es especialmente abundante, pero actualmente se sabe que se encuentra distribuida ampliamente en la mayoría de las células eucarióticas (Shi *et al*,



## Introducción

1998; Harding *et al*, 2000; Sood *et al*, 2000; Pomar *et al*, 2003). PERK es una proteína transmembrana que presenta el dominio catalítico (dominio quinasa) situado en el extremo carboxilo con un inserto de unos 200 aminoácidos; el dominio amino-terminal contiene el péptido señal y el dominio típico de las proteínas transmembrana de unos 20 aminoácidos (Figura 3). La proteína en la célula se encuentra de forma que su dominio regulador se sitúa en el lumen del retículo endoplásmico y el dominio con actividad quinasa se localiza en el citoplasma.



**Figura 3. Representación esquemática de las cuatro eIF2alfa quinazas de células de mamífero.** GCN2 de ratón (mGCN2), PKR humana (hPKR), PERK de ratón (mPERK) y HRI de rata (rHRI). Se observa como las cuatro eIF2alfa quinazas presentan un dominio catalítico con actividad quinasa (representado en color azul) dividido en dos partes por un inserto (color blanco) de longitud variable. Todas ellas presentan dominios reguladores diferentes que les permiten responder a distintos estímulos. Debajo de cada proteína quinasa aparece indicado el número de aminoácido en el que comienza y finaliza cada dominio y la función de cada uno de ellos.

PERK se activa en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (Ron, 2002). En condiciones normales, PERK se encuentra formando un complejo con la chaperona BiP, esta unión impide la dimerización de PERK y su consiguiente activación. PERK presenta un dominio regulatorio que se encuentra situado en el extremo N-terminal y al cual se asocia la chaperona BiP; dicho dominio guarda gran similitud con la proteína quinasa y endorribonucleasa

transmembrana IRE1, y actúa como sensor de estrés en el retículo. En presencia de proteínas mal plegadas BiP libera a PERK para interactuar con dichas proteínas y PERK, una vez libre, puede dimerizar, autofosforilarse y pasar a su estado activo. La activación de PERK conduce a un aumento de la expresión de chaperonas y también de varios factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, ATF4 y CHOP. NF- $\kappa$ B y CHOP promueven la paralización del ciclo celular y su expresión es dependiente de la fosforilación del factor eIF2alfa y la consiguiente traducción de la proteína ATF4 (Proud, 2005).

Mutaciones producidas en el dominio catalítico de PERK producen el síndrome de Wolcott-Rallison (Brickwood *et al*, 2003; Proud, 2005). Este síndrome se caracteriza por el desarrollo temprano de la diabetes de tipo I, osteoporosis, retraso en el crecimiento, anomalías cardiovasculares, daños renales y hepáticos y retardo mental (Delepine *et al*, 2000). Las causas de esta enfermedad ponen de manifiesto la importancia del control de la función del eIF2 para un normal funcionamiento fisiológico.

**-HRI:** La proteína quinasa regulada por hemina tiene un peso molecular aproximado de 70 kDa, es muy abundante en células eritroides y se activa en condiciones de falta de hierro o bajos niveles de grupos hemo (de Haro *et al*, 1996).

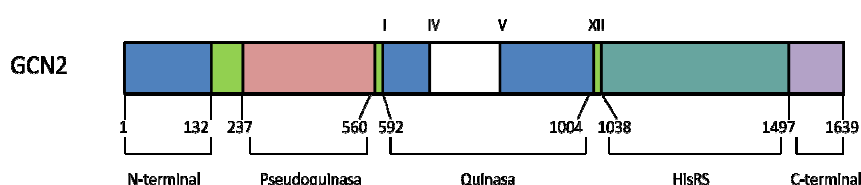
Contiene un dominio catalítico situado en el extremo carboxilo terminal (Figura 3). La zona amino terminal es importante para la especificidad, pero no es esencial para la actividad proteína quinasa (Uma *et al*, 2000). No se ha descrito una región destinada a funcionar como dominio regulatorio, pero se han caracterizado dos dominios de unión a hemina (forma oxidada del grupo hemo con  $\text{Fe}^{3+}$ ) que podrían estar regulando la actividad quinasa (de Haro *et al*, 1996; Chen, 2000). HRI regula la síntesis de  $\alpha$  y  $\beta$ -globinas en los glóbulos rojos disminuyendo su expresión cuando existe deficiencia de hierro, puesto que en esta situación las cadenas de globinas no pueden unirse para formar el tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  (Han *et al*, 2001).

Ensayos efectuados en lisados de reticulocitos ricos en hemina han permitido proponer que Hsp90 y Hsp70 se unen a la proteína quinasa HRI para garantizar su correcto plegamiento y mantenerla en estado inactivo (Uma *et al*, 1997; Chen, 2000). Una disminución en la concentración de hemina hace que una especie de HRI inmadura se active y forme la especie de HRI de tipo I hemo-reversible. Cuando los lisados son suplementados con hemina, esta especie es inhibida mediante un cambio conformacional que provoca que los grupos sulfhidrilos presentes en la proteína quinasa se acerquen y formen puentes disulfuro de forma que la región de unión a ATP quede inaccesible. Estos puentes disulfuro van a estabilizar los homodímeros de proteína quinasa que constituyen la especie de HRI tipo II. Cuando la cantidad de hemina disminuye, HRI de tipo I se autofosforila y forma la especie de HRI tipo III, que es

capaz de fosforilar al eIF2 (de Haro *et al*, 1996). La chaperona Hsp90 se libera durante el proceso de formación de la especie de HRI tipo I, sin embargo, la chaperona Hsp70 permanece unida manteniendo a la proteína quinasa inactiva. En situaciones de estrés, como el choque térmico, Hsp70 se libera permitiendo la actividad de la proteína quinasa, de modo que esta chaperona actúa como un sistema regulador de la actividad de la proteína quinasa independiente de la hemina (Uma *et al*, 1999). Otras situaciones como el estrés oxidativo o la presencia de metales pesados también activan HRI. HRI es la única eIF2alfa quinasa que se activa por la presencia de arsenito en células eritroides, mientras que el estrés osmótico y el choque térmico activan HRI, pero también GCN2 y PERK (Lu *et al*, 2001).

### 2.3.2. eIF2alfa quinasas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* solamente expresa la eIF2alfa quinasa GCN2. Esta quinasa consta de 1639 aminoácidos y contiene los dominios descritos para GCN2 de mamíferos (Figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de GCN2 de *S. cerevisiae*.**

GCN2 se activa cuando *S. cerevisiae* es sometida a privación de algún aminoácido o purina (Wek, 1994; Hinnebusch, 2000). Como consecuencia de la privación de aminoácidos en la célula se produce un incremento de ARNt deacilados que se van a unir al dominio HisRS; esta unión provoca un cambio conformacional en el dímero de GCN2 que rompe las interacciones inhibitorias y produce la disociación de Hsp90, lo que conduce a la autofosforilación de la proteína quinasa. Estos cambios, consecuencia de la activación de GCN2, van a permitir la unión y fosforilación del sustrato eIF2 (Hinnebusch, 2000).

### 2.3.3. eIF2alfa quinasas en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

En la levadura de fisión *S. pombe* se han descrito tres eIF2alfa quinasas: el homólogo de GCN2 de *Saccharomyces cerevisiae* y otras dos eIF2alfa quinasas

relacionadas con HRI de mamíferos, Hri1 y Hri2 (Zhan *et al*, 2002), que pueden ser inhibidas por hemina (Figura 5).

**-Gcn2:** Esta proteína, en *S. pombe*, está constituida por 1576 aminoácidos y contiene todos los dominios característicos de GCN2 conservados en los ortólogos descritos hasta el momento. Este hecho sugiere que el mecanismo de activación y la función de Gcn2, en *S. pombe*, es análoga a la descrita para esta proteína quinasa en *S. cerevisiae* y en mamíferos (Zhan *et al*, 2004).

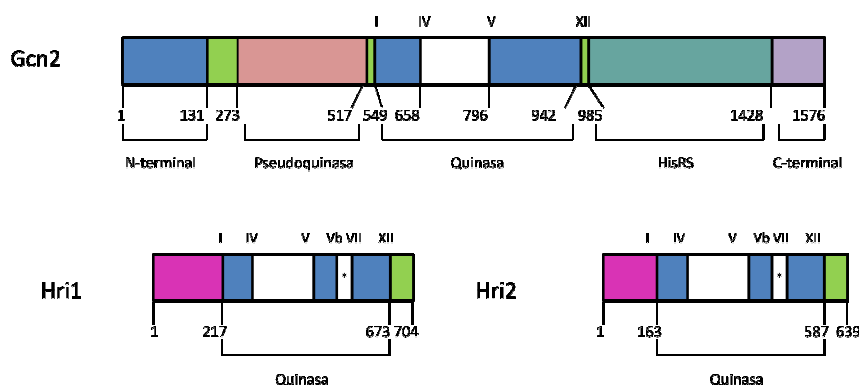
Esta proteína se activa rápidamente en situaciones de estrés oxidativo y también en presencia de un agente genotóxico (Zhan *et al*, 2004; Dunand-Sauthier *et al*, 2005). Además, en situaciones de choque térmico esta proteína quinasa se activa de forma tardía cuando no está Hri2.

**-Hri1 y Hri2:** Hri1 tiene un peso molecular aproximado de 85 kDa, presenta un dominio catalítico de 456 aminoácidos, una región amino terminal de 217 y un extremo carboxilo de 31. Hri2 tiene un peso molecular de aproximadamente 75 kDa y su dominio catalítico tiene 424 aminoácidos, el extremo amino terminal consta de 163 aminoácidos y el carboxilo de 52.

Estas proteínas presentan una homología entre sí del 45,8%, mientras que si comparamos cada una de ellas con HRI de mamíferos la similitud de Hri1 y Hri2 con HRI es de un 40,7% y de un 43% respectivamente (Herrero, 2000). La región mejor conservada es el dominio catalítico, a excepción de la región del inserto entre los subdominios IV y V que no presenta una gran similitud. Tanto el gen que codifica para Hri1, como el que codifica para Hri2, están localizados en el cromosoma I. El gen *hri2* contiene tres intrones mientras que en *hri1* no se ha identificado ninguno. Una característica que presentan estas dos eIF2alfa quinasas y que no comparten con ninguna otra de la familia, es la presencia de un segundo inserto de secuencia entre los subdominios VIb y VII del dominio proteína quinasa (Figura 5). Este inserto consta de 33 aminoácidos en Hri1 y de 21 en Hri2 (Herrero, 2000).

La especificidad de estas proteínas por el sustrato eIF2 es idéntica a la mostrada por HRI de mamíferos. Si se sustituye el residuo de 253 del subdominio II del dominio catalítico (lisina) de Hri1 o el residuo 200 de Hri2 por otro aminoácido se bloquea la capacidad de estas proteínas para autofosforilarse y fosforilar a eIF2 (Zhan *et al*, 2002).

Se sabe que Hri2 contribuye a la respuesta a situaciones de estrés, como la presencia de arsenito o arsenato en el medio de cultivo o al estrés por choque térmico, fosforilando a eIF2alfa; también Hri2 colabora en la respuesta de Gcn2 en situaciones de estrés oxidativo o en presencia de agentes genotóxicos (Zhan *et al*, 2002; Zhan *et al*, 2004). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ninguna situación de estrés que derivase en una fosforilación de eIF2alfa consecuencia de la activación de Hri1.



**Figura 5. Estructura de las tres eIF2alfa quinasas presentes en la levadura *S. pombe*.** El dominio quinasa aparece en azul y los insertos en color blanco, los dominios regulatorios de cada proteína quinasa aparecen en diferentes colores. En Hri1 y Hri2 aparece un segundo inserto en el dominio quinasa que aquí también figura en color blanco y marcado con un asterisco.

Dada la similitud con HRI de mamíferos, Hri1 y Hri2 podrían considerarse dos nuevos miembros de la familia HRI (Figura 5). Es el primer caso descrito de dos eIF2alfa quinasas de la misma familia presentes en un organismo. Esto hace pensar que estas proteínas quinasa están sometidas a mecanismos de regulación distintos, que les permite responder de manera diferencial a distintas formas de estrés celular.

### 3. Las MAP quinasas (MAPK) en *S. pombe*.

En todas las células eucarióticas, desde las levaduras hasta los mamíferos, las rutas de señalización en las que están implicadas las MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) regulan gran cantidad de procesos celulares que permitirán a las células adaptarse y responder a los cambios ambientales.

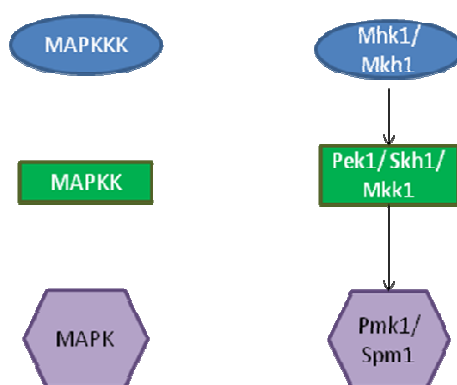
La respuesta de las MAPK a un estímulo extracelular se inicia generalmente con la unión de un ligando a un receptor específico de membrana que transmitirá el mensaje, utilizando para ello a las proteínas G, hasta las MAPK. La estructura básica de las cascadas de señalización de las MAPK se compone de tres proteínas quinasa que se activan de forma secuencial una vez reciben las señales ambientales que desencadenan la respuesta (Figura 6). Las MAPK quinasa quinasas (MAPKKK) fosforilan y activan a las MAPK quinasas (MAPKK), que a su vez fosforilan y activan a las MAPK (Marshall, 1994; Waskiewicz y Cooper, 1995). Para que las MAPK se activen, las MAPKK deben fosforilar a las MAPK en dos residuos, uno de tirosina y el otro de treonina, separados por un único aminoácido que puede ser prolina, glicina o ácido glutámico según el tipo de MAPK (Marshall, 1994; Waskiewicz y Cooper, 1995).

La activación de las MAPK por estímulos específicos va acompañada de cambios en la expresión génica que juegan un papel crucial en la respuesta adaptativa de las células a situaciones de estrés. Así, la activación de las MAPK, además de otras muchas respuestas, tiene como consecuencia la activación de factores de transcripción.

Las rutas de señalización de las MAPK generalmente se conocen por el nombre de la MAPK implicada. En *Schizosaccharomyces pombe* se han identificado tres rutas de MAPK: la ruta conocida como ruta de integridad celular (Pmk1/Spm1), la ruta de respuesta a feromonas (Spk1) y la ruta de respuesta a estrés (Sty1/Spc1/Phh1) (Shiozaki y Russell, 1995a; Toda *et al*, 1991).

### 3.1. Ruta de integridad celular.

La MAPK Pmk1 está regulada por la MAPKKK Mkh1 y la MAPKK Pek1 (Figura 6) (Sengar *et al*, 1997; Loewith *et al*, 2000; Sugiura *et al*, 1999). Pek1 fosforila a Pmk1 en los residuos de treonina y tirosina situados en las posiciones 186 y 188 (Sugiura *et al*, 1999). La ausencia de Mkh1 o de Pek1 impide la activación de Pmk1 (Madrid *et al*, 2006). Pmp1 es la fosfatasa encargada de regular negativamente la actividad de la ruta de Pmk1, defosforilando a ésta (Sugiura *et al*, 1998). La MAPKK Pek1 tiene una doble función en la regulación de esta ruta de señalización celular: cuando Pek1 no está fosforilada se une a Pmk1 e inhibe su actividad; sin embargo cuando Pek1 ha sido fosforilada por Mkh1, Pek1 actúa fosforilando a Pmk1 activándola (Sugiura *et al*, 1999).



**Figura 6. Esquema de la ruta de integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe*.**

Pmk1 es una proteína de 48 kDa que se fosforila y activa en situaciones de estrés osmótico, condiciones de oxidación y altas temperaturas y está involucrada en la

construcción de la pared celular, en la morfogénesis, la citocinesis y en la homeostasis (Zaitsevkaya-Carter y Cooper, 1997; Madrid *et al*, 2006).

Muchas de las condiciones ambientales que activan la ruta de integridad celular también activan la ruta de respuesta a estrés en la que interviene la MAPK Sty1 (Shiozaki y Russell, 1995a; Degols *et al*, 1996). En respuesta a cambios osmóticos, se ha descrito que existe una conexión entre Sty1 y Pmk1 (Madrid *et al*, 2006). Además, en respuesta al daño en la pared celular Pmk1 activa al factor de transcripción Atf1, factor de transcripción también activado por Sty1 (Takada *et al*, 2007). Ambas rutas de señalización de MAPK están reguladas negativamente por las fosfatasa Pyp1, Pyp2 y PP2C (Ptc1 y Ptc3), además Pmk1 modula los niveles de las fosfatasa Pyp1 y Ptc1 (Madrid *et al*, 2007). Sin embargo, Pmk1 no se activa en presencia de bajas cantidades de peróxido de hidrógeno, ni en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo y se fosforila en situaciones de hiposmolaridad, a diferencia de lo que sucede con Sty1.

### 3.2. Ruta de respuesta a feromonas.

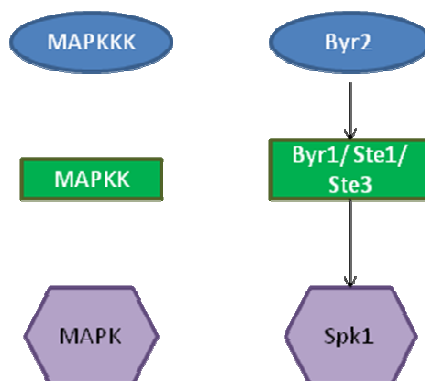
Las cepas de *S. pombe* pueden ser homotáticas ( $h^{90}$ ) o heterotáticas ( $h^+$  o  $h^-$ ), cuando las condiciones ambientales son normales las células se dividen por mitosis mediante fisión medial. En condiciones de privación de nitrógeno y baja temperatura (24°C) se produce la diferenciación sexual de las células y, si están presentes ambos tipos sexuales, las células conjugan, formando diploides, y se produce el proceso de meiosis para generar cuatro ascosporas haploides.

Cuando las células de distinto tipo sexual detectan que las condiciones ambientales no son favorables, se inicia un proceso que depende de la señalización por feromonas y que promueve la fusión entre las células de *S. pombe* para formar zigotos (Willer *et al*, 1995).

Las células de *S. pombe* presentan un receptor de membrana acoplado a una proteína G (Gap1) que les permite generar una respuesta a la señal de feromonas. En función del alelo que expresen en el locus *mat1*, las células serán del tipo sexual  $h^+$  o  $h^-$ . En las células  $h^-$  el receptor se activa por el factor P y en las células  $h^+$  se activa por el factor M, desencadenando la activación de la MAPK Spk1. La MAPKK encargada de fosforilar a Spk1 para activarla es Byr1, que a su vez es activada por la MAPKKK Byr2 (Figura 7), que se activa por la integración y transducción de la señal de feromonas (Toda *et al*, 1991; Neiman *et al*, 1993).

Spk1 activa y fosforila al factor de transcripción Ste11 (Kjaerulff *et al*, 2005). La activación de este factor de transcripción es necesaria para la expresión de genes

involucrados en la respuesta sexual: el receptor de feromonas, la MAPK Spk1, los genes del locus *mat1* y el gen *mei2*<sup>+</sup>, que codifica para una proteína de unión a ARN que juega un papel fundamental en el inicio de la meiosis (Sugimoto *et al*, 1991). Mei2 es un activador de la meiosis necesario para que se produzca la replicación del material genético antes de ésta; los niveles de expresión del gen que codifica para esta proteína van a depender de la cantidad de AMPc, pero también dependen de la MAPKK de la ruta de respuesta a estrés Wis1 (Stettler *et al*, 1996).



**Figura 7. Esquema de la ruta de respuesta a feromonas en *Schizosaccharomyces pombe*.**

### 3.3. Ruta de respuesta a estrés.

En la respuesta a estímulos ambientales, las células inducen un elaborado programa de reacción, que incluye cambios en la transcripción, en la traducción y en la progresión del ciclo celular, que les permita adaptarse. La activación de la ruta de respuesta a estrés (SAPKs) es esencial para promover estos cambios.

La ruta de señalización de Sty1 se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés como el choque térmico, en condiciones de alta osmolaridad, deficiencia de nutrientes en el medio o estrés oxidativo (Ikner y Shiozaki, 2005; Vivancos *et al*, 2006). En respuesta a estrés oxidativo (Figura 8), el conjunto de proteínas histidina quinasa Mak1 (Phk3), Mak2 (Phk1) y Mak3 (Phk2) van a actuar como sensores del estímulo. Una vez se produce la activación de este conjunto de proteínas, éstas van a fosforilar a Mpr1 (Spy1) en un residuo de histidina. Mpr1 cede el grupo fosfato a Mcs4 que actúa activando a la MAPKKK Wis4 (Shiozaki *et al*, 1997; Nguyen *et al*, 2000). Las MAPKKK, Wis4 y Win1, en respuesta al estrés, fosforilan a la MAPKK Wis1 que a su vez fosforila a Sty1 en sus residuos de treonina 171 y tirosina 173 activándola (Hohmann, 2002, Shiozaki y Russell, 1995a). Este mecanismo de fosforrelevo en el que están implicadas las rutas de las proteínas histidina quinasa y de las SAPKs, sólo se



activa en respuesta a determinadas situaciones de estrés, pero no en respuesta a todas ellas. Así, por ejemplo, se activa en situaciones de estrés oxidativo, pero no para responder a la presencia de arsenito (Shiozaki *et al*, 1997; Rodriguez-Gabriel y Russell, 2005).

Las tirosina fosfatasas Pyp1 y Pyp2 regulan, mediante defosforilación, la actividad de la ruta de respuesta a estrés. La hiperactivación de la ruta de Sty1 es letal para la célula y, por lo tanto, la delección de los genes que codifican para estas dos fosfatasas también lo es (Millar *et al*, 1992, Millar *et al*, 1995). Además, esta ruta también está regulada negativamente por las fosfatasas PP2C, Ptc1 y Ptc3 (Shiozaki y Russell, 1995b).

En situaciones de alta osmolaridad, para la activación de Sty1 se requiere de la actividad de las MAPKKK Wis4 y Win1 (Millar *et al*, 1995; Shieh *et al*, 1998; Shiozaki y Russell, 1995b; Shiozaki *et al*, 1998), pero se desconoce qué proteínas actúan como sensores cuando las células se enfrentan a esta situación de estrés. Para la respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio se requiere de la actividad de Wis1, sin embargo, la actividad de las MAPKKK Wis4 y Win1 no es imprescindible (Shieh *et al*, 1998).

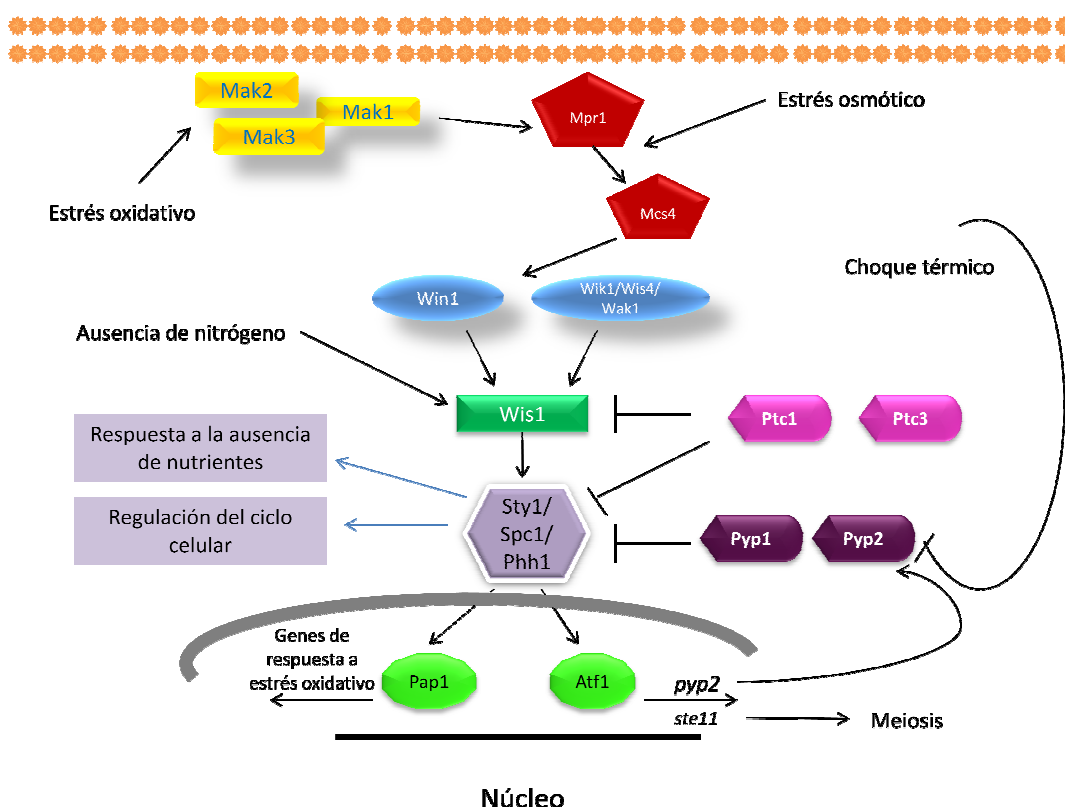
La respuesta a choque térmico es un tanto particular, ya que parece ser que se requiere la presencia de Wis1 para poder responder a esta situación de estrés, sin embargo, no es necesaria la activación de esta proteína quinasa mediante la fosforilación en sus residuos serina 469 y treonina 473. En situaciones de choque térmico la actividad basal de Wis1 va a fosforilar y activar a Sty1 sin que se requiera de la actividad de las MAPKKK Wis4 y Win1 (Shiozaki *et al*, 1998). El choque térmico inhibe a las fosfatasas Pyp1 y Pyp2, pero no a Ptc1 y Ptc3; este hecho sugiere que la activación basal de Wis1, junto con la inhibición transitoria de Pyp1 y Pyp2 consecuencia del choque térmico, desencadenan una activación transitoria de Sty1 que se atenúa rápidamente por la actividad de las serina treonina fosfatasas Ptc1 y Ptc3 (Nguyen y Shiozaki, 1999).

El mecanismo de activación de Sty1 en respuesta a la exposición a luz ultravioleta parece estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno que generarían un estrés oxidativo en las células (Degols y Russell, 1997).

La activación de Sty1 desemboca en un cambio en la expresión génica. Así, el conjunto de genes CESR (*Core environmental stress response*) se induce o se reprimen en la respuesta al estrés ambiental. Sty1 está implicada en la regulación de tres factores de transcripción: Atf1 (Takeda *et al*, 1995), Pap1 (Toda *et al*, 1992) y Prr1 (Ohmiya *et al*, 1999).

La fosforilación de Sty1 por parte de Wis1 permite que esta MAPK se pueda translocar al núcleo, una vez allí activa al factor de transcripción Atf1 (Gaits *et al*,

1998). Atf1 es un factor del tipo bZIP que se une a la secuencia consenso CRE (TGACGTCA) (Kano *et al*, 1996). Atf1 forma heterodímeros con otra proteína con dominio bZIP, Pcr1 (Gaits *et al*, 1998); esta interacción permite aumentar la vida media tanto de Pcr1 como de Atf1 (Lawrence *et al*, 2007). Se piensa que la función de Pcr1 pudiera ser la de estabilizar la unión de Atf1 a los promotores de los genes que regula (Sanzo *et al*, 2008); el heterodímero Atf1-Pcr1 se une a la mayoría de los genes englobados en CESR, aunque algunos de estos genes no requieren de ambos factores para su activación.



**Figura 8.** Esquema de la ruta de respuesta a estrés (SAPK) en *Schizosaccharomyces pombe*.

El factor de transcripción Atf1, en situaciones de estrés osmótico, regula la expresión de algunos genes importantes: *gdp1+*, que codifica para la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa; *ctt1+*, que codifica para la catalasa que actúa contra el peróxido de hidrógeno; *fbp1+*, fructosa 1-6 bisfosfato; *pyp2+*, que desfosforila e inactiva a Sty1; *ste11+*; y su propio mensajero *atf1+* (Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson *et al*, 1996; Degols y Russell, 1997; Nakagawa *et al*, 1999; Nakagawa *et al*, 2000; Neely y Hoffman, 2000). Este factor también interviene en la respuesta a estrés oxidativo debido

a la presencia de peróxido de hidrógeno, ya que regula la expresión de *tps1+*, que codifica para la treolasa 6 fosfato sintasa, y de *ctl1+*.

En situaciones de ausencia de nitrógeno en el medio, Atf1 es imprescindible para la parada del ciclo celular en la fase G1 y para la activación de Ste11, que es un factor de transcripción que regula los genes requeridos para llevar a cabo la conjugación y la meiosis (Takeda *et al*, 1995). Es por esto que las células que carecen de Sty1 o de Atf1 no son capaces de parar el ciclo celular en G1 en ausencia de nutrientes y, por ello, son prácticamente estériles (Shiozaki y Russell, 1996).

El factor de transcripción Atf1 se necesita para la activación de la transcripción de Pyp2 y de Atf1; Pyp2 regula negativamente la ruta, mientras que Atf1 lo hace de forma positiva. Esto indica que esta ruta está altamente regulada, de modo que se pueda obtener una respuesta rápida a las diferentes situaciones de estrés (Wilkinson *et al*, 1996).

En situaciones de estrés oxidativo Sty1 activa a Atf1 y también a Pap1. Sty1 no fosforila directamente a Pap1, por lo que se piensa que es posible que Sty1 intervenga en la translocación al núcleo de Pap1 (Toone *et al*, 1998). Pap1 modula la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo, entre los que se encuentra de nuevo el gen de la catalasa (Nguyen *et al*, 1999). Pap1 interviene en la respuesta a bajos niveles de peróxido de hidrógeno mientras que Atf1 es necesario para la respuesta a altas concentraciones de dicha sustancia (Nguyen *et al*, 2000; Quinn *et al*, 2002; Vivancos *et al*, 2004).

El factor de transcripción Prr1 se sabe que es necesario para la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo (Ohmiya *et al*, 1999) y que está involucrado en el control de la expresión de Ste11 en situaciones de ausencia de nitrógeno (Ohmiya *et al*, 2000).

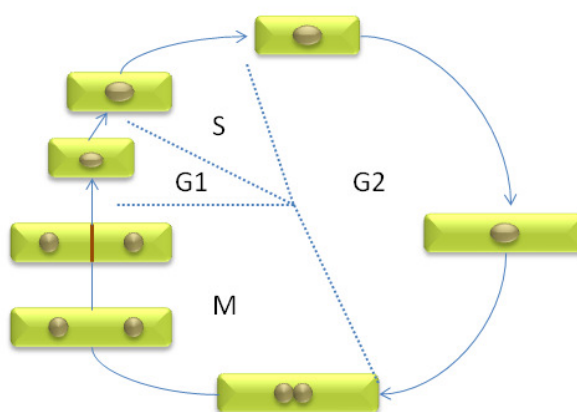
Sty1, además de regular factores de transcripción, activa a las proteínas quinasa reguladas por MAPK (MAPKAP): Cmk2 y Srk1 (Asp y Sunnerhagen, 2003). Srk1 interviene en el control del ciclo celular de *S. pombe* en el paso de la fase G2 a la fase M.

Estudios previos demuestran que la ruta de señalización de las MAPK puede contribuir positiva o negativamente en la regulación de la actividad eIF2alfa quinasa para permitir una respuesta coordinada al estrés ambiental (Dunan-Sauthier *et al*, 2005). En función del tipo de estrés la activación de cada una de las rutas de señalización es diferente. Cada una de las eIF2alfa quinasas juega un papel específico en la célula de modo que ésta pueda generar una respuesta concreta en función del estrés que esté sufriendo. La ruta de las MAPK se va a activar en respuesta a las diferentes condiciones de estrés promoviendo la activación de Sty1 mediante diferentes mecanismos. Esta

variabilidad en la integración de las señales de estrés conlleva una diversificación de la respuesta, de modo que, en función del tipo de estrés se establecerán o no conexiones entre las distintas rutas de señalización.

### 4. El ciclo celular de *S. pombe*.

El ciclo celular es un proceso complejo mediante el cual una célula es capaz de producir dos células hijas. *S. pombe*, cuando se encuentra en un medio de cultivo rico y en condiciones favorables, sigue un ciclo mitótico que consta de cuatro fases: una muy breve fase G1; una fase S en la que las células haploides duplican su material genético; una fase G2 en la que las células aumentan su tamaño; y una fase M (mitosis) en la que se produce la división celular (Figura 9). El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por tener las fases G1 y S muy cortas y una fase G2 muy larga; generalmente, el 70% del tiempo que las células necesitan para llevar a cabo un ciclo celular completo lo pasan en fase G2 (Nurse, 1975).



**Figura 9. Esquema del ciclo celular de *S. pombe*.** Consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M, las células de *S. pombe* se encuentran mayoritariamente en la fase G2.

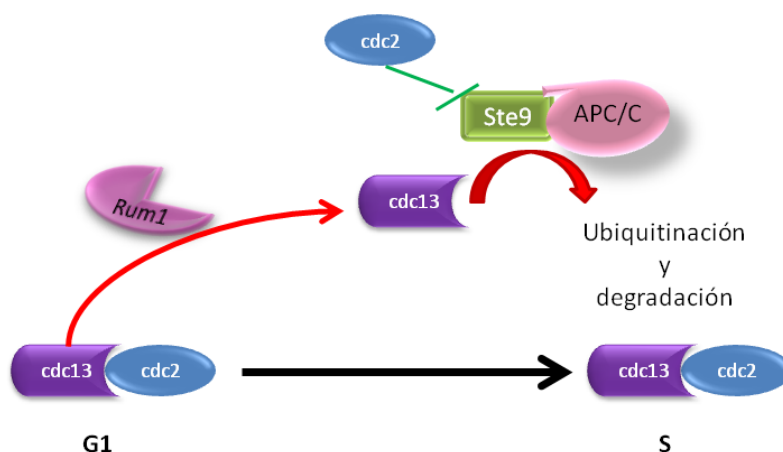
El ciclo celular de *S. pombe* presenta dos puntos de control principales: el punto de control START al final de la fase G1, para permitir la entrada en la fase S (Nurse y Bissett, 1981); y el punto de control entre las fases G2 y M. Estos puntos de control regulan el ciclo celular impidiendo su avance cuando la replicación del ADN no es correcta o las condiciones ambientales no son las adecuadas (Rhind y Russell, 1998).

La maquinaria que controla la progresión del ciclo celular está muy conservada en células eucariotas, tanto en levaduras como en mamíferos y plantas (De Veylder *et al*, 2007). Las proteínas más importantes en el control del ciclo celular son las proteínas

## Introducción

quinasa dependientes de ciclinas (Cdk) y su fosforilación/defosforilación resulta determinante para la progresión del ciclo celular. En *S. pombe* Cdc2 es la única Cdk esencial para la regulación de los dos puntos de control principales existentes en su ciclo celular (Nurse y Bissett, 1981). Cdc2 es una serina treonina quinasa indispensable durante todas las fases del ciclo celular, cuya inactivación impide la mitosis de las células. Cdc2 interacciona con las ciclinas de tipo B: Cig1, Cig2, Puc1 y Cdc13 (Bueno *et al*, 1991, Forsburg y Nurse, 1991). Rum1 y Ste9-APC actúan como reguladores negativos de los complejos Cdc2-ciclina durante la fase G1 del ciclo celular (Figura 10) para impedir la entrada en la fase S (Moreno y Nurse, 1994).

Cig1 y Cig2 promueven el paso de G1 a S, mientras que Puc1 interviene regulando negativamente los niveles de Rum1 al final de la fase G1 (Martin-Castellanos *et al*, 2000). El complejo formado por Cdc2-Cdc13 va a ser determinante para la correcta consecución de las fases S y M. Cdc13 es la única ciclina esencial, las células que carecen de ella paran el ciclo en G2-M y no pueden llevar a cabo la mitosis. Rum1 regula el complejo Cdc2-Cdc13, previene que las células en G1 entren en mitosis antes de haber replicado su ADN. La duración de la fase G1 va a estar controlada por Rum1, ya que inhibe los complejos Cdc2-Cig2 y Cdc2-Cdc13 hasta que las células tienen la masa mínima necesaria para poder iniciar la fase S y replicar el ADN (Moreno y Nurse, 1994).

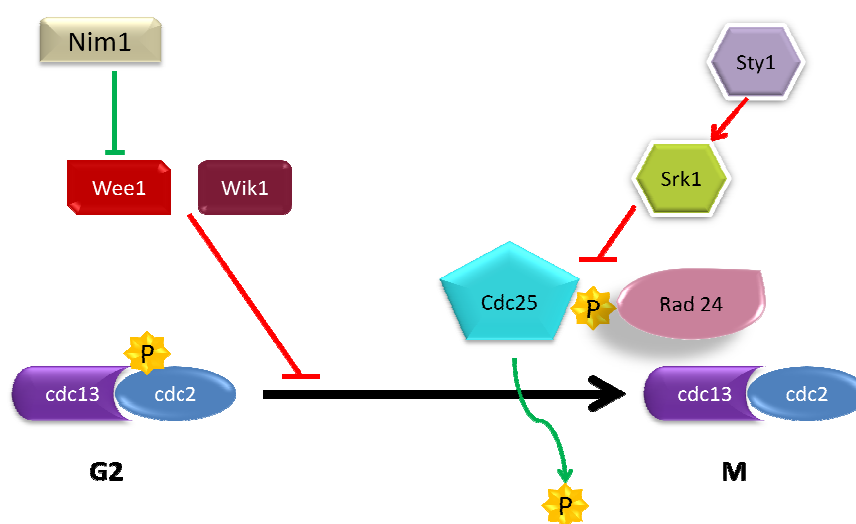


**Figura 10. Esquema del punto de control entre las fases G1 y S del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*.** Este punto de control previene que las células inicien la fase S y repliquen el ADN antes de alcanzar la masa necesaria para ello o en situaciones desfavorables para la división celular.

## Introducción

Rim1 se une al complejo Cdc2-Cd13 inhibiendo su actividad y promoviendo la proteólisis de Cdc13 (Correa-Bordes y Nurse, 1995). Cdc13 se ubiquitina y se degrada vía proteasoma. Ste9 activa el complejo APC que poliubiquitina proteínas para su degradación. La fosforilación de Ste9 por Cdc2 va a conducir a la degradación de Ste9 que evita que se asocie con APC y poliubiquitine a Cdc13 (Figura 10). Cuando hay una cantidad suficiente del complejo Cdc2-Cdc13 se permite la entrada en fase S para la duplicación del ADN (Blanco *et al*, 2000).

Tras la duplicación del ADN las células se encuentran en la fase G2 y Cdc2 está formando parte del complejo Cdc2-Cdc13, cuya actividad está inhibida por fosforilación de Cdc2. Las tirosina quinasas Wee1 y Mik1 fosforilan a Cdc2 en su Tyr15 impidiendo la entrada en mitosis (Russell y Nurse, 1987b, Millar *et al*, 1995). Wee1 está regulada negativamente mediante fosforilación por Nim1. Al final de la fase G2, cuando las células han alcanzado el tamaño necesario, se activa la fosfatasa Cdc25, que defosforila a Cdc2, activándose el complejo Cdc2-Cdc13 y permitiendo el inicio de la mitosis (Millar *et al*, 1995). Srk1 es una proteína quinasa sustrato de Sty1 que se activa en situaciones de estrés osmótico, fosforilando e inhibiendo a la fosfatasa Cdc25, favoreciendo la detención del ciclo celular en G2 (Figura 11). La proteína Rad24 puede unirse a Cdc25 cuando ésta se encuentra fosforilada, esta unión permite la acumulación de Cdc25 en el citoplasma y la protege de la degradación (Lopez-Aviles *et al*, 2005).



**Figura 11. Esquema del punto de control entre las fases G2 y M del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*.** La entrada en mitosis depende de la competición entre los elementos de regulación Wee1 y Cdc25 en función de la concentración de los mismos. La actividad de estos componentes, a su vez, va a depender del tamaño de las células.

La entrada en mitosis implica una competición entre los elementos de regulación positivos y negativos dependiente de su concentración. En situaciones en las que la expresión de Wee1 está aumentada las células se dividen a un tamaño mayor. En aquellas células que carecen de Wee1 la entrada en mitosis se adelanta y las células se dividen a la mitad del tamaño de las células silvestres (Russell y Nurse, 1987a; Russell y Nurse, 1987b). En células silvestres, las células se dividen por fisión medial cuando alcanzan un tamaño de unos 14  $\mu\text{m}$  y las células hijas tendrán un tamaño de 7  $\mu\text{m}$  cada una; estas células hijas crecen hasta alcanzar los 14  $\mu\text{m}$  y entonces se dividen dando lugar a dos células hijas cada una (Martin, 2009).

### 4.1. Papel de Sty1 en la regulación del ciclo celular de *S. pombe*.

La ruta de señalización de Sty1 participa en la regulación del ciclo celular controlando la evolución de éste en función del tamaño alcanzado por las células. Esta ruta de señalización actúa como nexo entre las señales promovidas por cambios extracelulares que afectan a la fisiología de la célula y el punto de control G2-M. Las células que carecen de Sty1 presentan un defecto en la transición de G2 a M; el retraso en este paso hace que estas células sean el doble de largas que las células de fenotipo silvestre (Millar *et al*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995a). Aquellas células que presentan sobre-activación de la ruta de Sty1 entran antes en mitosis y tienen un tamaño inferior que las células silvestres (Millar *et al*, 1992; Millar *et al*, 1995; Warbrick y Fantes, 1991).

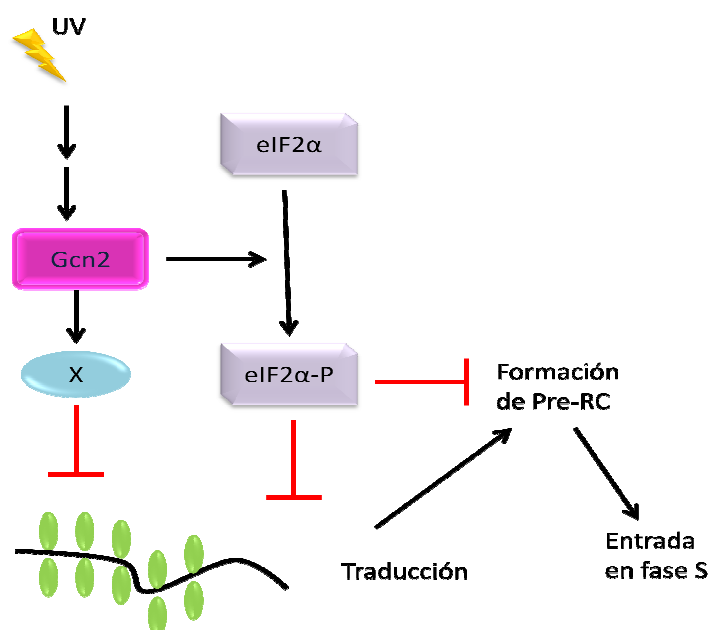
En situaciones de estrés osmótico, Sty1 se activa y fosforila a Srk1, Srk1 activada fosforila e inhibe a la fosfatasa Cdc25, de modo que ésta no puede defosforilar a Cdc2 y se impide el paso de G2 a M (Lopez-Aviles *et al*, 2008). Srk1, además, en situaciones de privación de nutrientes, actúa permitiendo la conjugación de las células (Asp y Sunnerhagen, 2003).

La ruta de respuesta a estrés, ante determinados cambios en el ambiente extracelular, activa a Cdc2 mediante la activación de la proteína quinasa Plo1 (Petersen y Hagan, 2005). La activación de Sty1 promueve la fosforilación de Plo1 facilitando el reclutamiento de ésta por SPBs (Spindle Pole Bodies) y permitiendo la entrada en mitosis. Cuando se produce una disminución en los niveles de Pyp2 como consecuencia de la inhibición de la ruta de señalización de Tor1, se incrementa la actividad de Sty1, la fosforilación de Plo1 y la activación de Cdc2. Esta ruta de señalización modula el punto de control del ciclo en función del tamaño celular para la entrada en mitosis cuando se producen cambios en la disponibilidad de nutrientes en el medio. En situaciones en las que las células tienen limitadas las fuentes de nitrógeno se activa esta ruta de señalización para que las células puedan pasar el punto de control G2-M rápidamente,

entrando en mitosis y llegando de nuevo a G1, donde las células pararán su ciclo celular para favorecer la diferenciación sexual (Petersen y Nurse, 2007). Cuando las condiciones ambientales que suponen un estrés para la célula desaparecen también se activa esta ruta de señalización, promoviendo el retorno a un ciclo celular normal tras la parada de éste (Petersen y Hagan, 2005).

### 4.2. Papel de las eIF2alfa quinasas en la regulación del ciclo celular de *S. pombe*.

La fosforilación del factor eIF2alfa, en respuesta a diferentes tipos de estrés, permite a las células conservar recursos y aumentar la expresión de proteínas necesarias para la respuesta al estrés (Deng *et al*, 2002; Jiang y Wek, 2005; Jiang *et al*, 2003; Wu *et al*, 2002). Una regulación anormal de la traducción puede conllevar cambios en la expresión de proteínas oncogénicas o de supresores tumorales, de hecho los niveles de eIF2alfa se ven aumentados en algunos tipos de cáncer (Clemens, 2004). Todos estos datos apuntan a que el factor eIF2alfa y su fosforilación juegan un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular.



**Figura 13. Regulación del ciclo celular por Gcn2.** Diagrama propuesto por Tvegard *et al* en 2010 para explicar las posibles interacciones moleculares ocurridas tras la irradiación con luz UV, dichas interacciones tienen como fin producir una disminución en la traducción y un retardo en el ciclo celular. X representa una proteína desconocida.

Durante los últimos años se ha podido observar una correlación entre la transición de la fase G1 a la fase S y la fosforilación del factor eIF2alfa en respuesta a

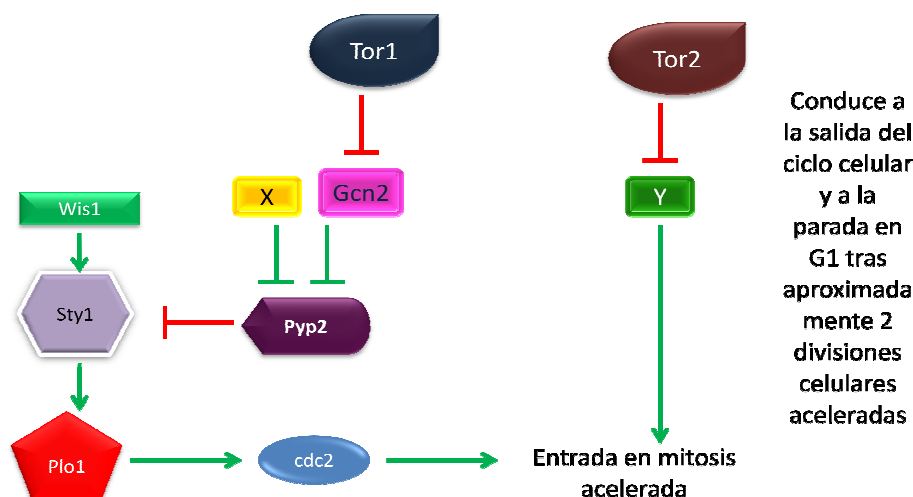


determinados agentes que afectan a la estructura del ADN en *S. pombe* (Krohn *et al*, 2008). Existe un punto de control G1-S que actúa de manera independiente a la fosforilación de Cdc2 (Figura 13); este punto de control es dependiente de la actividad de la eIF2alfa quinasa Gcn2 (Tvegard *et al*, 2007).

Cuando las células de *S. pombe* son sometidas a la presencia de determinados agentes con actividad genotóxica, la presencia de Gcn2 y su actividad fosforilando al factor eIF2 son necesarias para que se produzca un retraso en el paso de G1 a S, previniendo la presencia de alteraciones en el ADN (Tvegard *et al*, 2007; Krohn *et al*, 2008). La duración del retraso en la entrada en la fase S del ciclo celular tras dicha exposición correlaciona con la duración del incremento de los niveles de eIF2alfa fosforilado. No todos los tratamientos que provocan alteraciones en el ADN inducen la fosforilación del factor eIF2 y el retraso en la entrada en la fase S del ciclo, a diferencia de lo que sucede en el punto de control G2-M, que en respuesta a la presencia de cualquier agente dañino para el ADN, provoca la parada del ciclo celular impidiendo que las células entren en mitosis.

Las células eucariotas necesitan alcanzar un tamaño crítico para poder entrar en mitosis y dividirse; este proceso, en ocasiones, está modulado por la disponibilidad de nutrientes (Mitchison, 2003; Kim *et al*, 2002; Dolznig *et al*, 2004; Jorgensen y Tyers, 2004). La proteína TOR (*Target of rapamycin*) es una proteína quinasa conservada desde levaduras hasta el hombre que controla el crecimiento celular en respuesta a la limitación de nutrientes (Fingar y Blenis, 2004). En la levadura de fisión hay dos proteínas de la familia TOR: Tor1 y Tor2. Ambas proteínas quinasa están implicadas en la respuesta celular tras la retirada de nitrógeno del medio de cultivo, pero únicamente Tor2 es esencial para el crecimiento (Weisman y Choder, 2001). La respuesta de las células de *S. pombe* a la ausencia de nitrógeno en el medio conlleva la salida del ciclo celular y la diferenciación sexual. Tor1 es necesaria para la respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio, para la parada del ciclo celular en G1 en dichas condiciones y para el inicio del desarrollo sexual. Tor1, además, interviene en la respuesta a situaciones de estrés osmótico, oxidativo, térmico y cambio de pH (Kawai *et al*, 2001). Tor2 es una proteína necesaria en condiciones normales de crecimiento y un regulador clave en el paso del crecimiento vegetativo a la diferenciación sexual. El complejo TORC1, del que forma parte Tor2, está involucrado en el control de la síntesis de proteínas: la retirada de la fuente de nitrógeno provoca una caída en la fosforilación de la proteína ribosomal Rsp6 dependiente de Tor2 (Nakashima *et al*, 2010).

La inactivación de la ruta de señalización de Tor1, por la retirada de la fuente de nitrógeno o por un tratamiento con rapamicina, conduce a la activación de la MAPK Sty1 y favorece la entrada en mitosis de las células (Figura 14).



**Figura 14. Regulación de la entrada en mitosis por las proteínas TOR.** Diagrama propuesto por Petersen y Nurse en 2007, para explicar la regulación que ejerce TOR para la entrada en mitosis a través de la ruta de las SAPK y de las proteínas quinasa Plo1 y Cdc2. X e Y representan a proteínas desconocidas.

En respuesta a la privación de nitrógeno, Tor1 se inactiva, esto promueve la activación de la eIF2alfa quinasa Gcn2. Gcn2, una vez activa, modula negativamente los niveles de Pyp2, lo que conduce a un incremento en la actividad de Sty1 (Petersen y Nurse, 2007). La activación de Sty1 conlleva la fosforilación de la proteína Plo1 y la activación de Cdc2, promoviendo el paso de G2 a M (Mulvihill *et al*, 1999; Petersen y Hagan, 2005; MacIver *et al*, 2003). Esta ruta de señalización es necesaria para modular el control dependiente de la longitud de las células para la entrada en mitosis en situación de privación de nitrógeno. En esta situación este mecanismo acelera la entrada en mitosis para promover la salida del ciclo celular y la diferenciación sexual (Petersen y Nurse, 2007).

## **Objetivos**

***“Un deseo presupone la posibilidad de la acción necesaria para su logro, Una acción presupone un objetivo digno de ser alcanzado”.***

***Ayn Rand.***



## Objetivos

---

En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* tres eIF2alfa quinasas fosforilan al factor eIF2 en su subunidad alfa en respuesta a las diferentes condiciones de estrés ambiental: el ortólogo de GCN2 de *Saccharomyces cerevisiae*; y dos proteínas relacionadas con el HRI de mamíferos, Hri1 y Hri2. Estas tres eIF2alfa quinasas se activan en diferentes situaciones de estrés regulando negativamente la iniciación de la traducción.

La SAPK Sty1 es una proteína esencial para la regulación de respuestas que promueven la supervivencia de las células en situaciones de estrés. En situaciones fisiológicas de estrés se produce la parada del ciclo celular para evitar una desregulación del mismo que pueda llevar a una situación patológica. Sty1 interviene en la regulación del ciclo celular de esta levadura tras determinadas situaciones de estrés para mejorar la supervivencia en *S. pombe*. Del mismo modo, la fosforilación de eIF2 está asociada con la parada del ciclo celular y la proliferación.

Por todo ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Caracterización funcional de las eIF2alfa quinasas de *Schizosaccharomyces pombe* en respuesta a diferentes situaciones de estrés.
2. Estudio de la coordinación entre las rutas de señalización de Sty1 y de las eIF2alfa quinasas en respuesta al estrés celular.
3. Estudio del papel de las eIF2alfa quinasas en la regulación del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe* en situación de privación de nitrógeno.



## ***Materiales y Métodos***

***“El método significa aquella organización de la materia de estudio que la hace más eficaz en el uso”.***

***John Dewey.***





## MATERIALES

### 1. Cepas de *Escherichia coli*.

Para la producción de las diferentes construcciones de plásmidos se utilizó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) con genotipo *supE44lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

### 2. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

Para la realización de este trabajo se utilizaron cepas de *S. pombe* con diferentes modificaciones genéticas. Las características de estas cepas se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Relación de cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo	Procedencia
WT	972 $h^-$	P. Nurse
WT leu-	<i>leu-32 h^-</i>	P. Nurse
$\Delta$ Hri1	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	S. Moreno
$\Delta$ Hri2	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	S. Moreno
$\Delta$ Gcn2	<i>gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h^-</i>	S. Moreno
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Hri2	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h^-</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Gcn2	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h^-</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri2 $\Delta$ Gcn2	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Hri2 $\Delta$ Gcn2	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	Este laboratorio
$\Delta$ Sty1	<i>spc1:: ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	E. Hidalgo
$\Delta$ Pyp1	<i>pyp1:: ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h<sup>+</sup></i>	E. Hidalgo
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Hri2 $\Delta$ Sty1	<i>spc1:: ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Hri2 $\Delta$ Pyp1	<i>pyp1:: ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Gcn2 $\Delta$ Sty1	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri1 $\Delta$ Gcn2 $\Delta$ Pyp1	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri2 $\Delta$ Gcn2 $\Delta$ Sty1	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18<sup>+</sup></i>	Este laboratorio
$\Delta$ Hri2 $\Delta$ Gcn2 $\Delta$ Pyp1	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18<sup>+</sup></i>	Este laboratorio
Hri1-Ha	<i>hri1::hri1-HA/Kan h^-</i>	Este laboratorio
Hri2-Ha	<i>hri2::hri2-HA/Kan h^-</i>	Este laboratorio

Gcn2-Ha	<i>gcn2::gcn2-HA/Kan<sup>r</sup></i>	Este laboratorio
eIF2 $\alpha$ S52A	<i>eIF2S52A::ura4<sup>+</sup>ura4-d18</i>	E. Boye
WT h <sup>90</sup>	972 h <sup>90</sup>	M.A. Rodríguez-Gabriel
$\Delta$ Sty1 h <sup>90</sup>	<i>spc1::ura4<sup>+</sup>ura4-d18 leu1-32 h<sup>90</sup></i>	M.A. Rodríguez-Gabriel
eIF2 $\alpha$ S52A h <sup>90</sup>	<i>eIF2S52A::ura4<sup>+</sup>ura4-d18 h<sup>90</sup></i>	Este laboratorio

### 3. Medios de cultivo.

#### a) *E. coli.*

LB (Luria-Bertani): bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro sódico 10 g/l.

Para el medio sólido se añadió un 1.5% de Bacto-Agar.

#### b) *S. pombe.*

-YES (Yeast Extract plus Supplements): glucosa 30 g/l, extracto de levadura 5 g/l, suplementado con 50-250 mg/l de adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina, y con los 20 aminoácidos esenciales a una concentración 225 mg/l.

-YE -G: YES sin glucosa.

-EMM (Edinburgh Minimal Medium): glucosa 20 g/l, fosfato disódico 2,2 g/l, phthalato potásico 3 g/l, cloruro de amonio 5 g/l, sales, vitaminas y minerales (Moreno *et al*, 1991).

Se suplementó dicho medio con los aminoácidos/nucleótidos requeridos para el crecimiento de determinadas cepas hasta una concentración de 225 mg/l por cada aminoácido/nucleótido.

Para la represión de la expresión del plásmido pSty1.41x se añadió al medio EMM tiamina a una concentración final 0,5  $\mu$ M.

-EMM-N: EMM sin cloruro de amonio.

-EMM-G: EMM sin glucosa, para los ensayos en medio líquido se suplementó con glicerol a una concentración final 3%.

-ME (Malt Extract): Bacto Malt Extract 30 g/l.

Los medios YES, YE-G, EMM, EMM-G y EMM-N se compraron a la casa comercial BIO101, el medio ME se adquirió de Difco y los aminoácidos/nucleótidos utilizados como suplementos y la tiamina se obtuvieron de Sigma.

Para los correspondientes medios sólidos se añadió un 1.5% de Bacto Agar a los medios anteriores.

#### 4. Anticuerpos.

Para las inmunoprecipitaciones y análisis por *Western blot* se utilizaron los siguientes anticuerpos.

Anticuerpo anti-eIF2 $\alpha$ : Policlonal de conejo que reconoce el eIF2alfa producido por la casa comercial Santa Cruz (Ref. FL315).

Anticuerpo anti-eIF2 $\alpha$ -P: Policlonal de conejo que reconoce específicamente la serina 51 fosforilada de la subunidad alfa del eIF2, producido por Cell Signaling (Ref. 9721).

Anticuerpo anti-p38-P: Policlonal de conejo, reconoce la fosforilación en la tirosina 182, adquirido en SAB (Signalway Antibodies) (Ref. 11253-2).

Anticuerpo anti-HA: Monoclonal de ratón, obtenido en la casa comercial Covance (Ref. MMS-101R).

Anticuerpo anti-cdc2: Monoclonal de ratón, producido por Abcam (Ref. ab5467).

Anticuerpo anti-cdc2-P: Policlonal de conejo que reconoce específicamente la tirosina 15 fosforilada, adquirido en Cell Signaling (Ref. 9111S).

Otros anticuerpos comerciales empleados en *Western blot* fueron los secundarios conjugados con peroxidasa anti-IgG de conejo y ratón (Promega).

#### 5. Productos químicos.

La acrilamida, bisacrilamida, glicina, SDS, persulfato amónico, marcadores de peso molecular pre-teñidos y TEMED fueron de Bio-Rad. Tween20, Trizma base, fenol en solución, DTT y ATP fueron adquiridos de Sigma. El PEG 8000 y el ATP radiactivo [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3000 Ci/mMol), se adquirieron en GE Healthcare.

Bromuro de etidio, inhibidores de proteasas y fosfatasas (Complete<sup>®</sup> y Phostop<sup>®</sup>), ampicilina, DNAsa, RNAsa A y la seroalbúmina bovina fueron adquiridos de Roche Molecular Biochemicals.

La agarosa se obtuvo de Hispanagar y el agar de Pronadisa.

La Zimoliasa 20T fue de Seikagaku América y la proteína G-Sefarosa de GE Healthcare.

El resto de las sales inorgánicas y productos orgánicos procedían de Merck.

## MÉTODOS

### 1. Métodos de cultivo y transformación de *Escherichia coli*.

Las bacterias se incubaron de manera rutinaria durante 16 horas a 37°C en agitación a 200 rpm en medio LB que fue suplementado con el antibiótico Ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Para conseguir colonias aisladas las bacterias se incubaron 16 horas a 37°C en medio sólido. Para la extracción del ADN plasmídico se utilizaron columnas para minipreps y maxipreps comerciales de Promega y Quiagen, respectivamente.

Para la obtención de células competentes y su posterior transformación se aplicó el método descrito por Inoue *et al* (1990).

### 2. Métodos de cultivo de *Schizosaccharomyces pombe*.

Las levaduras se crecieron en medio sólido YES-Agar para su mantenimiento.

Las levaduras se incubaron para condiciones estándar a 30-32°C con agitación a 180-200 rpm en medio YES. Para los ensayos en medio mínimo EMM, las levaduras se incubaron en iguales condiciones.

### **3. Manipulación de ácidos nucleicos.**

#### **3.1. Electroforesis de ácidos nucleicos.**

La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo empleando geles con una concentración de agarosa entre el 0.8 y el 1.5%. Estos geles se prepararon utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato, EDTA).

Para visualizar los fragmentos de ADN por exposición a luz ultravioleta se utilizó un agente intercalante, bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml.

Los marcadores de pares de bases fueron adquiridos en el Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Consisten en los fragmentos resultantes de la ruptura del ADN del fago  $\phi 29$  ó del fago  $\lambda$ , con la enzima de restricción Hind III.

#### **3.2. Transformación de células de *S. pombe*.**

Para la obtención de células competentes y su posterior transformación se utilizó el método del acetato de litio propuesto por Moreno *et al* (1991).

Las cepas *Wild-type* (PN22) y  $\Delta Sty1$  se transformaron con el plásmido pStyl.41x (obtenido de Hidalgo, E.), que expresa una versión de la proteína Styl etiquetada con el epítipo HA y seguida de una cola de 6 histidinas. Éste plásmido presenta un promotor *nmt1* (41x) cuya expresión puede reprimirse por tiamina (Millar *et al*, 1995).

#### **3.3. Extracción de ADN genómico de células de *S. pombe*.**

Para la extracción del ADN genómico se siguió el protocolo propuesto por Moreno *et al* (1991), partiendo de 10 ml de cultivo de *S. pombe* en fase estacionaria.

#### **3.4. Reacción en cadena de la polimerasa.**

La amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción de polimerización en cadena (PCR), se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer), según las condiciones requeridas en cada caso. La ADN polimerasa Platinum<sup>R</sup> *Taq* se adquirió de Invitrogen y los dNTPs de Biotools.

### 3.5. Extracción de ARN total de células de *S. pombe*.

Para la obtención de ARN total se emplearon  $50 \times 10^6$  células de *S. pombe* en fase exponencial media, utilizando el sistema *SV Total RNA Isolation* de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6. PCR con transcriptasa reversa.

Utilizando 1  $\mu$ g de ARN total de *S. pombe*, se generaron cadenas de ADNc por transcripción reversa utilizando la enzima AMV y el siguiente oligonucleótido (*Reverse Transcription System* de Promega):

- Oligo dT 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN 3'

(V=A, C ó G; N= A, C, G ó T).

La reacción se llevó a cabo, en un volumen final de 20  $\mu$ l, mediante incubación a 42°C durante 15 minutos. Para inactivar el enzima, a continuación se incubó a 95°C durante 5 minutos.

### 3.7. PCR en tiempo real

La amplificación del ADNc se llevó a cabo utilizando el sistema LightCycler 3, empleando el kit *LightCycler® FastStart Master<sup>PLUS</sup> SYBR GreenI* de Roche y los oligonucleótidos que figuran en la siguiente tabla (Invitrogen y Sigma).

**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de ARN mensajeros mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.**

Oligonucleótido	Secuencia
Hri1S7 Sense	5' ATT CCA AGA GGA CTC GGT TGC AGA T 3'
Hri1A7 Antisense	5' TGA CTT CGT TGG CGC CAA CTT TCC T 3'
Hri2S8 Sense	5' AGA TTG ACG TGT CTG AAT ACG 3'
Hri2A8 Antisense	5' CGT TGA CAT CAC AAT AGC TTG AG 3'
Gcn2S3 Sense	5' ATT CTA CCG GAA GGG CTG TAT CC 3'
Gcn2A3 Antisense	5' CTT AAC AAG TCA ATG GCG CTA GG 3'
ACTINAS4 Sense	5' TCG ATT GTC GGT AGA CCC CGT CA 3'
ACTINAA4 Antisense	5' AGC AAC ACG AAG CTC GTT GTA GAA 3'

Cantidades iguales (2  $\mu$ l de la reacción de transcripción reversa) de ADNc sirvieron como molde para reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real. Como control de cantidad de un ARNm que no cambia se utilizó el de la actina. El análisis

de los datos para determinar la cantidad relativa del ARNm de cada una de las quinasas se llevó a cabo utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### 4. Técnicas genéticas.

Muchas de las cepas utilizadas para la realización de este estudio se obtuvieron por cruce genético de dos cepas parentales de tipo sexual opuesto.

Las cepas parentales se mezclaron y, posteriormente se sembraron en una placa de medio ME sólido (ME-Agar), donde se incubaron a 25°C durante un mínimo de 48 horas.

Las tétradas resultantes se diseccionaron utilizando un microscopio para diseccionar tétradas (Singer) en placas de YES Agar que se incubaron a 32°C durante 72 horas.

Una vez germinadas las esporas, se seleccionaron las colonias utilizando placas de medio selectivo, posteriormente se aisló el ADN genómico y se confirmó por PCR el genotipo de las cepas, siguiendo el protocolo propuesto por Moreno *et al* (1991) y utilizando los oligonucleótidos que figuran en la tabla 3 (Invitrogen y Sigma).

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de cepas recombinantes mediante la técnica de PCR a tiempo final.**

Oligonucleótido	Secuencia
Hri1C1 Sense	5' AGA GGT ATC CGG GGA AAT CC 3'
Hri1C2 Antisense	5' CTG TTG AAC TGA AAA CTA GC 3'
-300-Hri2 Sense	5' CAC GAC CAT AGT CAG TAG AAA CC 3'
Hri2C2 Antisense	5' CTG CTG TTC AAC ATT CTT GG 3'
Gcn2C1 Sense	5' CCA GTA TAC TGC GTT CTT CC 3'
Gcn2C2 Antisense	5' ACA TTG AGC TTG CAA ACC CG 3'
Sty1C1 Sense	5' CGA TAT AGA CGA AGG ACG CT 3'
Sty1C2 Antisense	5' CCA TGG AAC CGA GAT GAT AT 3'
Pyp1C1 Sense	5' GGC CTT CAA AAC TTG TGC TGC TA 3'
Pyp1C2 Antisense	5' GAC AAC GTG ATT AAA GCA AC 3'
Hri1 HAC1 Sense	5' AAA GGG CAT CAG CTA TCG CC 3'
Hri1 HAC2 Antisense	5' TAA GGC GCC TAA TGA AGT GC 3'
Hri2 HAC1 Sense	5' TCC TGA AGA GTT CGT TGA GC 3'

Hri2 HAC2 Antisense	5' AAG CTC AGA GTC TGA ATC CG 3'
Gcn2 HAC1 Sense	5' ATG ATC TAG TGC ATC AGC C 3'
Gcn2 HAC2 Antisense	5' CGT TGA TAA AAC TCA GGA GG 3'

## 5. Ensayos de estrés celular.

Se prepararon 10 ml de pre-cultivo de *S. pombe* en medio YES o en medio EMM, en función del medio en el que se realizó posteriormente el ensayo de estrés, a partir de colonias crecidas previamente en medio sólido YES-Agar. Dicho pre-cultivo se mantuvo incubando durante toda la noche a 25-32°C, en función de las necesidades de la cepa, en agitación a 180-200 rpm. Posteriormente, se hicieron las diluciones adecuadas y se dejaron crecer por al menos dos generaciones hasta la fase exponencial media: densidad óptica a 595 nanómetros ( $DO_{595nm}$ ) = 0.6-0.7 en el caso del medio YES o  $DO_{595nm}$  = 0.2 en el caso del medio EMM. Posteriormente fueron sometidas a los distintos tratamientos.

### 5.1. Estrés oxidativo.

Los cultivos de *S. pombe* fueron incubados en medio YES con peróxido de hidrógeno a una concentración de 1.5 mM durante diferentes períodos de tiempo. Al finalizar los tiempos, las células se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad (1500 x g) durante 3 minutos y el sedimento de células obtenido se congeló inmediatamente en hielo seco.

### 5.2. Estrés por daño en el ADN.

Los cultivos de *S. pombe* fueron incubados en medio YES con un agente genotóxico conocido como metil metanosulfonato (MMS) a una concentración final de 0.02% (v/v) en el medio YES durante diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento para la congelación de los sedimentos celulares que en el caso anterior.

### 5.3. Estrés térmico.

Los cultivos de *S. pombe* en medio YES se sometieron a temperaturas de 40°C o 48°C, según el caso, durante diferentes períodos de tiempo, posteriormente, los sedimentos celulares se congelaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para el estrés oxidativo.

### 5.4. Estrés por ausencia de glucosa.

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en medio mínimo (EMM), se lavaron dos veces con medio mínimo sin glucosa, para eliminar los restos de glucosa que



podieran quedar en el cultivo y, posteriormente, se mantuvieron durante diferentes períodos de tiempo en este medio suplementado con un 3% de glicerol (EMM-G), para evitar el estrés osmótico consecuencia de la ausencia de fuentes de carbono en el medio.

Los sedimentos celulares se congelaron siguiendo los mismos pasos que en los anteriores tipos de estrés.

### **5.5. Estrés por ausencia de nitrógeno.**

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en medio EMM, se lavaron dos veces con medio mínimo sin nitrógeno (EMM-N) y se mantuvieron durante diferentes períodos de tiempo en dicho medio. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento para la congelación de los sedimentos celulares que en los anteriores casos.

### **5.6. Estrés causado por el gasto de nutrientes en el medio de cultivo.**

Células de *S. pombe* se mantuvieron en cultivo en medio YES, cuando este cultivo alcanzó 0.5, 1, 2, 3 y 4 unidades de densidad óptica a 595 nm se recogieron muestras de un volumen de 10 ml. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento para la congelación que con los sedimentos celulares anteriores.

## **6. Ensayos de viabilidad en placa.**

Para los experimentos de estrés en placa, las células se cultivaron en 10 ml de medio YES o EMM hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 unidades a 595 nm en medio YES o 0.25 unidades en medio EMM. A partir de este cultivo se prepararon, mediante diluciones seriadas, alícuotas de entre  $10^5$  y  $10^6$  células que se sembraron por goteo.

### **6.1. Estrés oxidativo en placa.**

Los diferentes cultivos se sembraron en placas de EMM en ausencia o presencia de 0.75 mM de peróxido de hidrógeno y se mantuvieron durante 72 horas a 32°C.

### **6.2. Estrés por daño en el ADN en placa.**

Los diferentes cultivos se mantuvieron en placas de medio EMM en ausencia o presencia de 0.02 de MMS y se mantuvieron durante 72 horas a 32°C.

### 6.3. Estrés térmico en placa.

Los diferentes cultivos se sembraron por goteo en placas de EMM-Agar y se incubaron a 40°C durante 24 horas para el choque térmico, después se mantuvieron durante 48 horas a 32°C. Para las condiciones control se sembraron las gotas de cultivo en placas de EMM-Agar y se mantuvieron 72 horas a 32°C.

### 6.4. Estrés por ausencia de glucosa en placa.

Los diferentes cultivos se sembraron en placas de EMM con un 1% de glucosa o un 2% de glucosa, para las condiciones control, y se mantuvieron durante 72 horas a 32°C.

## 7. Recuento de células para estimar el porcentaje de apareamiento.

Utilizando la cámara de Neubauer cuantificamos el número de células que se encuentran en un estado determinado. El porcentaje de apareamiento se calculó como el porcentaje de células en conjugación o formando tétradas con respecto al total. Se realizó por un lado el conteo de los cigotos, por otro el de las tétradas y, por último, el resto de células que no han conjugado. Teniendo en cuenta que cada cigoto o tétrada procede de la fusión de dos células, se calculó el porcentaje de apareamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Apareamiento} = \frac{(\text{Cigotos} + \text{Tétradas}) \times 2}{[(\text{Cigotos} + \text{Tétradas}) \times 2] + \text{Células}} \times 100$$

## 8. Análisis de proteínas.

### 8.1. Obtención de extractos proteicos de *S. pombe*.

Los sedimentos celulares de 10 ml de cultivo de células de *S. pombe* se resuspendieron en 0.2 ml de tampón de lisis que contiene: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (v/v) Tritón-X100, 25 µg/ml de DNasa e inhibidores de proteasas (Complete<sup>®</sup>, Roche) y fosfatasa (Phostop<sup>®</sup>, Roche). Las células se rompieron en un homogeneizador Fast Prep FP120 (BIO 101) o Fast Prep-24 (MP), en 4 ciclos de 30 segundos a una potencia de 6 y manteniendo los extractos en hielo durante al menos un minuto entre cada ciclo. La concentración de proteína total de los lisados, clarificados mediante centrifugación a

15000 x g durante 12 minutos a 4°C, se calculó utilizando el método de Bradford (Protein assay, Bio-rad).

### 8.2. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según los métodos estándar descritos por Sambrook *et al* (1989) con los sistemas de minigeles Miniprotean II y III (BioRad). El porcentaje de acrilamida usado fue 9% acrilamida/ 0.26% bisacrilamida y en otros casos se utilizaron geles en gradiente de acrilamida del 5% al 15%.

### 8.3. Western Blot.

Las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF Inmobilon-P (Millipore), previamente tratadas con metanol, según instrucciones del fabricante, empleando el sistema de transferencia húmeda de BioRad. La transferencia se realizó en el tampón Tris-Glicina suplementado con un 8% de metanol durante 70 minutos a 110 voltios a 4°C.

Una vez finalizada la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, ésta se lavó en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl y 0.05% Tween-20), a continuación se bloqueó la membrana durante una hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en TBS-T y se incubó en la misma solución con anticuerpo primario durante 16 horas a 4°C y en agitación con diferentes concentraciones dependiendo del anticuerpo. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T y se incubó con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo o ratón obtenido de cabra y conjugado con peroxidasa (Promega) en leche desnatada al 5% en TBS-T durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 5 veces durante 5 minutos con TBS-T y una vez con TBS. La detección de proteínas se llevó a cabo con el sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech) en películas Agfa Curix RP2 Plus. El revelado se realizó en una máquina reveladora Kodak M35 X-OMAT.

En los casos en los que se llevaron a cabo sucesivos *Western blot* sobre las mismas membranas, tras la detección de las proteínas se lavó la membrana en TBS-T durante 5 minutos y se realizó un tratamiento para eliminar los anticuerpos unidos a la membrana a 50°C en agitación constante con la siguiente solución: 62.5 mM de Tris/HCl pH 6.8, SDS al 2% y β-mercaptoetanol 100 mM.

### 8.4. Métodos de cuantificación por densitometría.

La cuantificación de los resultados de *Western blot* se llevó a cabo utilizando el densitómetro GS-710 de Bio-Rad y el programa “Quantity One”, teniendo en cuenta

la cantidad de proteína total presente en cada muestra con el fin de normalizar los datos.

Para determinar la relación existente entre los valores obtenidos en las muestras sometidas a tratamiento respecto a los controles sin tratar, se dividieron tanto la magnitud obtenida de la muestra tratada como la del control entre el control mismo, asumiendo, por lo tanto, que el control tiene un valor de 1.

### 8.5. Inmunoprecipitación.

Lisados de *S. pombe* (entre 1 y 5 mg de proteína total) se incubaron durante 16 horas con agitación constante a 4°C, en presencia de 50 µl de proteína G-Sefarosa (Pharmacia-Biotech) y 10 µg de anticuerpo anti HA.

Transcurrido el tiempo de incubación, los complejos inmunes se lavaron una vez con tampón de lisis con alta sal (NaCl 500 mM) y dos veces más con tampón de lisis. Los inmunocomplejos se re-suspendieron en 10 µl de un tampón que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT para, posteriormente, llevar a cabo ensayos de fosforilación *in vitro*.

### 8.6. Ensayo de fosforilación *in vitro*.

Los inmunocomplejos se incubaron a 30°C durante 30 minutos en un volumen final de 20 µl de tampón de fosforilación (50 µM ATP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM acetato de magnesio, 0.25 mg/ ml BSA, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5 µg de eIF2alfa recombinante,  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3 µCi). Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción con 4 µl de tampón de Laemmli 6X. El análisis del resultado se hizo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), autorradiografía utilizando películas Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (GE Healthcare) y *Western blot* con anticuerpos específicos.

## 9. Técnicas de citometría de flujo.

Se utilizaron técnicas de citometría para estimar la cantidad relativa de ADN presente en cada célula individual y así poder definir la fase del ciclo celular en que se encontraba la mayor parte de la población de las células.

Se cultivaron células de *S. pombe* en medio mínimo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.25 unidades a 595 nm (células asincrónicas). El cultivo se centrifugó a 1500 x g y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado dos veces

con medio mínimo sin nitrógeno y se resuspendió en dicho medio. Se tomaron muestras del cultivo tras permanecer durante diferentes períodos de tiempo en ausencia de nitrógeno hasta llegar a las 24 horas. Por centrifugación a 1500 x g durante 3 minutos se sedimentaron las células presentes en 1 ml de cultivo, éstas se lavaron con 1 ml de agua miliQ y se fijaron con 1 ml de etanol al 70%. Una vez transcurridas al menos 24 horas desde su fijación, las células se rehidrataron en 0.5 ml de citrato sódico 50 mM pH 7.0 y se trataron con 0.1 mg/ml de ribonucleasa A (RNasa A, Roche) durante al menos 2 horas a 37°C. Posteriormente, las muestras se llevaron hasta un volumen final de 1 ml con citrato sódico y se añadió yoduro de propidio (Sigma) hasta alcanzar una concentración de 2 µg/ml para marcar las cadenas de ADN. Las muestras permanecieron 16 horas a 4°C en oscuridad y, posteriormente, se sonicaron durante 1 ciclo de 20 segundos a una amplitud de 30 utilizando un sonicador Labsonic M (Sartorius). Las muestras se procesaron en un citómetro Beckman Coulter utilizando el programa informático Cell Quest Pro, los datos se analizaron con el soporte informático Flow Jo 6.4.1.

### 10. Técnicas de microscopía.

Se sedimentaron las células de *S. pombe* presentes en 0.2 ml de cultivo a 0.25 unidades de densidad óptica a 595 nanómetros por centrifugación a 1500 x g durante 5 minutos y se fijaron con etanol al 70%. Transcurridas 24 horas, las células se rehidrataron en 1 ml de agua miliQ que, posteriormente, se eliminó, dejando aproximadamente 30 µl de agua. En un portaobjetos de vidrio se depositaron 3 µl de la suspensión de células fijadas y éste se calentó a 70°C durante 1 minuto de forma que las células quedasen formando una monocapa. A continuación, sobre la monocapa se añadieron 2 µl de Mowiol (DABCO) conteniendo 1 µg/ml de DAPI (Calbiochem), se cubrió con un cubreobjetos y se dejó incubando al menos una noche a 4°C en oscuridad. Los resultados se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss) acoplado a una cámara ccd Coolsnap FX color (Roper Scientific).

Todos los resultados recogidos en esta memoria son representativos de los obtenidos, al menos, en tres experimentos independientes.



## **Resultados**

***“Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos pensado; está fundado en nuestros pensamientos y está hecho de nuestros pensamientos”.***

***Buda.***





### 1. Estudio de la activación diferencial de las eIF2alfa quinasas de *S. pombe* en respuesta al estrés y su regulación por la MAPK (SAPK) Sty1.

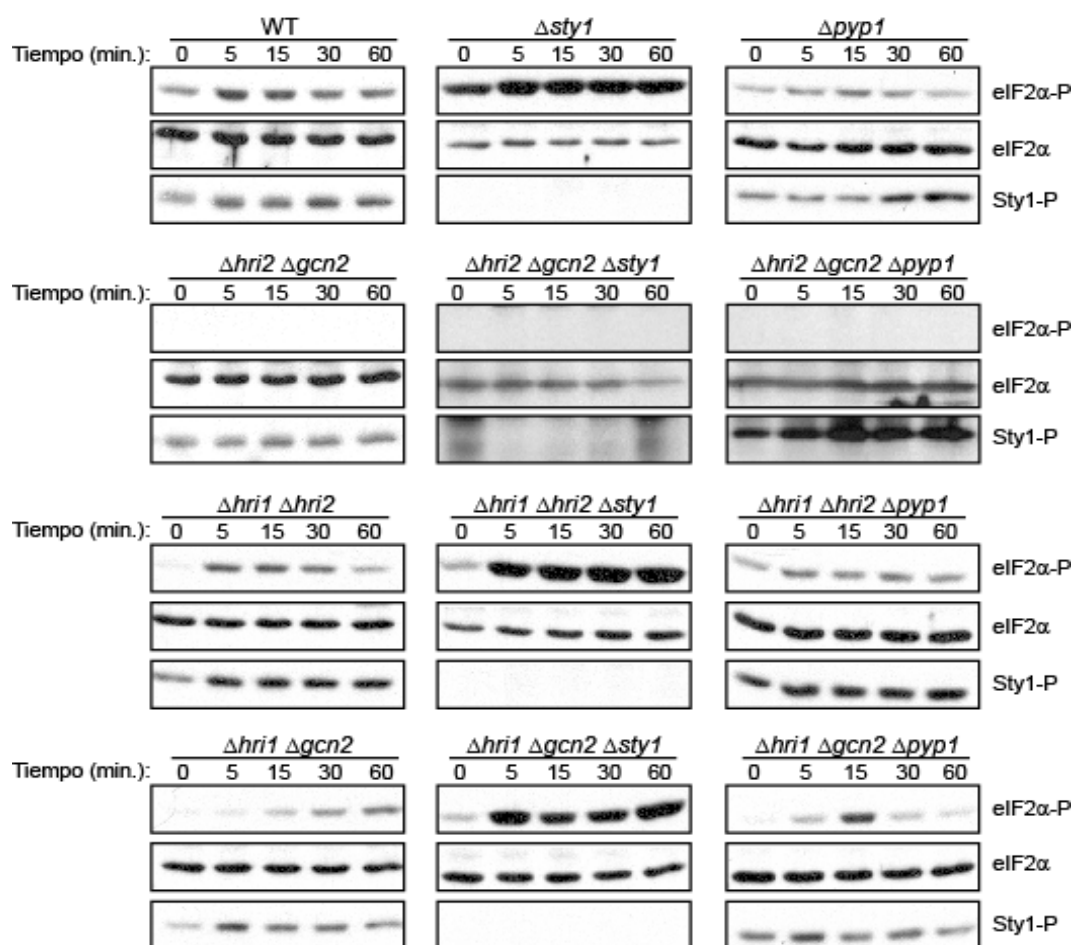
#### 1.1. Respuesta a estrés oxidativo.

Con el fin de conocer la participación de cada una de las tres eIF2alfa quinasas de *S. pombe* en la respuesta a diferentes situaciones de estrés ambiental, utilizamos distintas cepas de dicha levadura: la cepa silvestre y cepas que únicamente expresan Hri1, Hri2 o Gcn2. Para intentar evidenciar la participación de Sty1 en la regulación de la actividad de las eIF2alfa quinasas utilizamos cepas que carecen del gen que codifica para Sty1 o del gen que codifica para la fosfatasa Pyp1. Para estudiar el papel regulador de Sty1 sobre cada una de las eIF2alfa quinasas se utilizaron cepas que sólo expresan una eIF2alfa quinasa y que además carecen del gen que codifica para Sty1 o del gen que codifica para Pyp1 (Tabla 1 del apartado de Materiales y Métodos).

Previamente, se había sugerido la existencia de una activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a diferentes tipos de estrés (Zhan *et al*, 2004). Dicho trabajo concluía que Hri2 y Gcn2 se activaban de igual forma en respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio, tras 1 hora de tratamiento. Nosotros, nos propusimos estudiar la contribución individual de Hri2 y de Gcn2 durante el transcurso del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Para ello, se mantuvieron en cultivo las cepas descritas anteriormente entre 0 y 60 minutos, en presencia de 1.5 mM peróxido de hidrógeno. Mediante análisis por *Western blot*, se determinaron los niveles de eIF2alfa fosforilado, estimando así la actividad de cada eIF2alfa quinasa en respuesta al estrés. También se analizó del mismo modo la activación de Sty1 (Figura 15).

En la cepa silvestre se produce un rápido incremento de la fosforilación de eIF2alfa, que se observa ya a los 5 minutos de tratamiento y que se mantiene hasta los 60 minutos. Además, comprobamos que únicamente la cepa que sólo expresa Gcn2 responde de modo similar en el tiempo a la cepa silvestre. Cuando sólo está presente Hri2 también se produce un incremento en la fosforilación de eIF2alfa, pero retrasado en el tiempo con respecto a la cepa que sólo expresa Gcn2, y de menor intensidad. En la cepa que sólo presenta Hri1 no se observa ningún incremento en los niveles de fosforilación de eIF2alfa en respuesta a estrés oxidativo.

Estos resultados sugieren que Gcn2 es la principal eIF2alfa quinasa responsable de la respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio. Sin embargo, a tiempos tardíos y, al menos en ausencia de Gcn2, Hri2 también se activa en respuesta a estrés oxidativo.

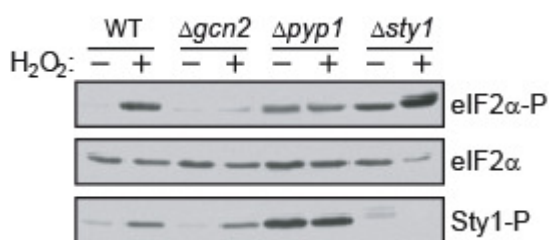


**Figura 15. Activación diferencial de las distintas eIF2alfa quinasas en respuesta a estrés oxidativo. Papel de la MAPK Sty1.** Diferentes cepas de *S. pombe* se sometieron a estrés oxidativo por presencia de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1.5 mM. La fosforilación del eIF2alfa y de Sty1 se analizó, utilizando extractos celulares totales, mediante *Western blot* con anticuerpos fosfoespecíficos, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Como control de cantidad de proteína en los extractos, se analizó igualmente la presencia de eIF2alfa total. En la parte superior de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y los tiempos de tratamiento, y a la derecha el anticuerpo utilizado.

La vía de señalización de Sty1 es la principal ruta de respuesta a diferentes situaciones de estrés en *S. pombe*; Sty1 se activa por fosforilación en sus residuos treonina 171 y tirosina 173 (Shiozaki y Russell, 1995a). Pyp1 y Pyp2 son las tirosina fosfatasas que defosforilan la tirosina 173 de Sty1, inactivándola (Shiozaki y Russell, 1995a). Dado que en la respuesta a estrés oxidativo se produce una rápida activación de la ruta de señalización mediada por Sty1, decidimos estudiar una posible relación entre esta ruta y la activación de las eIF2alfa quinasas. Utilizando cepas carentes del gen que codifica para Sty1 o para su modulador negativo Pyp1, se evaluó la capacidad reguladora de Sty1 sobre la actividad de cada una de las eIF2alfa quinasas (Figura 15).

## Resultados

Así pudimos observar que a los 5 minutos Sty1 se fosforila en respuesta a estrés oxidativo y dicha fosforilación se mantiene hasta los 60 minutos. También encontramos que en aquellas cepas que carecen de Sty1, los niveles de fosforilación de eIF2alfa aumentaron significativamente, tanto a nivel basal como en respuesta al tratamiento (Figuras 15 y 16). Además, en las cepas que carecen del regulador negativo de Sty1, Pyp1, y por tanto tienen Sty1 hiperactivada, observamos una considerable disminución en los niveles de fosforilación de eIF2alfa. En las células que únicamente tienen Gcn2, la ausencia de Sty1 se traduce, al igual que en la cepa silvestre para las eIF2alfa quinasas, en un aumento en la fosforilación de eIF2alfa, mientras que en las células que sólo expresan Hri2, la ausencia de Sty1, además, conlleva una activación más temprana de Hri2.

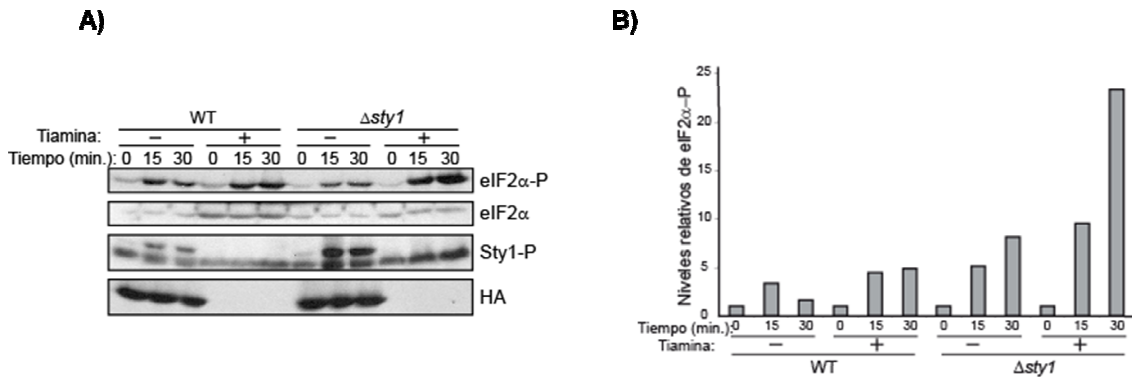


**Figura 16. Regulación por la MAPK Sty1 de la fosforilación del factor eIF2 en repuesta a estrés oxidativo.** Las cepas indicadas en la parte superior de la figura se sometieron a estrés oxidativo por presencia de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1.5 mM durante 15 minutos. La fosforilación del eIF2alfa y de Sty1 se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. Debajo del nombre de las cepas se indica si se añadió peróxido de hidrógeno (+) o no (-) y a la derecha el anticuerpo utilizado.

Nuestros resultados indican que Sty1 regula negativamente la actividad de Gcn2 y de Hri2 inducida por estrés oxidativo, sin embargo, la ausencia de las eIF2alfa quinasas no parece influir en la respuesta de Sty1 al estrés oxidativo.

Para confirmar que Sty1 modula la actividad de las eIF2alfa quinasas Gcn2 y Hri2 sometimos a estrés oxidativo a células silvestres (WT) y a células carentes de Sty1 ( $\Delta sty1$ ) que sobre-expresan la proteína recombinante Sty1-HA-6xHis de forma regulada por un promotor *nmt1* reprimible por tiamina (Figura 17).

Como puede observarse, en presencia de tiamina, cuando la expresión de Sty1 recombinante está reprimida, en las células  $\Delta sty1$  se observó una mayor fosforilación de eIF2alfa que en la cepa silvestre. Tanto en la cepa silvestre, como en la cepa  $\Delta sty1$ , cuando retiramos la tiamina del medio de cultivo, estimulando la expresión Sty1 recombinante, observamos una caída muy significativa en los niveles de fosforilación de eIF2alfa con respecto a lo observado en ausencia de sobre-expresión de Sty1 (Figura 17 A y B). La proteína recombinante Sty1-HA-6xHis se expresa correctamente y, además, se activa en respuesta a estrés oxidativo (Figura 17A).



**Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de Sty1 sobre la fosforilación de eIF2α en respuesta a estrés oxidativo.** **A)** La fosforilación del eIF2α y de Sty1 se analizó en extractos de células de *S. pombe* por Western blot utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. En la parte superior se indica el nombre de la cepa utilizada, si las células crecieron en ausencia o en presencia de tiamina y el tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno 1.5 mM. A la derecha de la figura a parece el nombre del anticuerpo utilizado en cada caso. **B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de eIF2α fosforilado (relación eIF2α-P/eIF2α y referido a las células no tratadas, cuyo valor se tomó como 1) de los resultados del panel A.

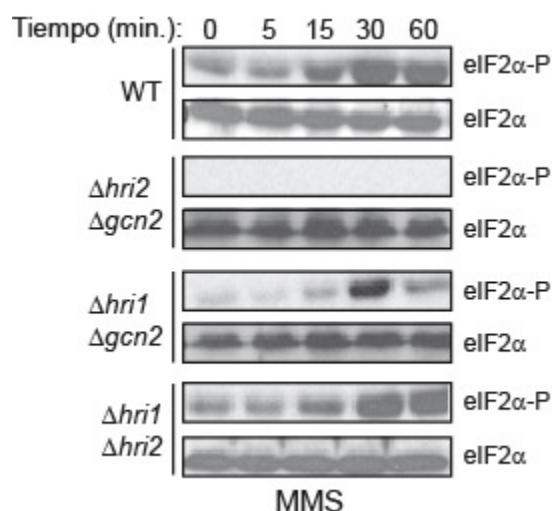
Por lo tanto, podemos concluir, que en *S. pombe* Sty1 regula negativamente la actividad de las eIF2α quinasas Gcn2 y Hri2 a través de mecanismos aún desconocidos. Es decir, en ausencia de Sty1 se produce un incremento en la fosforilación de eIF2α en respuesta a estrés oxidativo, mientras que, por el contrario, en ausencia de la fosfatasa encargada de la regulación negativa de Sty1 o en condiciones de sobreexpresión de Sty1, disminuyen los niveles de eIF2α fosforilado.

## 1.2. Respuesta a la exposición al agente genotóxico MMS.

Se ha descrito que en la levadura *S. pombe* la exposición al agente genotóxico MMS provoca la fosforilación del factor eIF2α (Krohn *et al*, 2008). Por ello, nos propusimos conocer cuál es la contribución de cada una de las tres eIF2α quinasas en la respuesta a este tipo de estrés, analizando la cinética de fosforilación de eIF2α en la cepa silvestre y en cepas que sólo expresan una de las tres eIF2α quinasas (Figura 18).

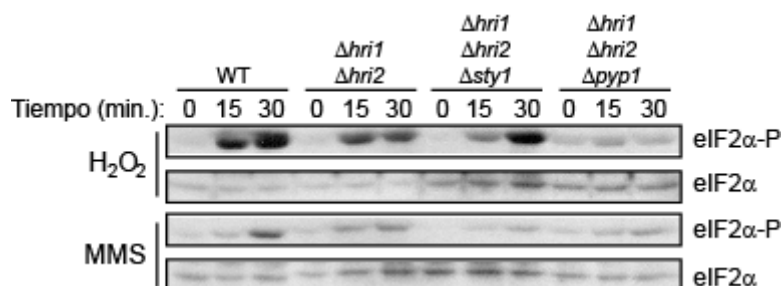
Tanto en la cepa silvestre como en la que sólo expresa Gcn2, se observa un significativo aumento de eIF2α fosforilado a los 15 minutos de tratamiento con MMS, que se mantiene al menos hasta los 60 minutos. Como en el caso del estrés oxidativo Hri2 también se activa de forma más tardía (a partir de los 30 minutos), mientras que Hri1 tampoco parece responder a este tipo de estrés.

## Resultados



**Figura 18. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a MMS.** Diferentes cepas de *S. pombe*, según se indica, se sometieron a un tratamiento con MMS a una concentración final de 0.02% durante los periodos de tiempo indicados en la parte superior de la figura. La fosforilación del eIF2alfa se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. En la parte izquierda de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y a la derecha el anticuerpo utilizado.

Para estudiar la posible implicación de Sty1 en la regulación de la actividad de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la presencia de MMS, utilizamos la cepa silvestre, la cepa que sólo expresa la eIF2alfa quinasa Gcn2 y las cepas que sólo expresan esta eIF2alfa quinasa y además carecen de Sty1 o de su regulador negativo Pyp1. Analizamos la influencia de la presencia y la actividad de Sty1 sobre la fosforilación de eIF2alfa en respuesta a estrés oxidativo, como control positivo, y en respuesta a estrés genotóxico.

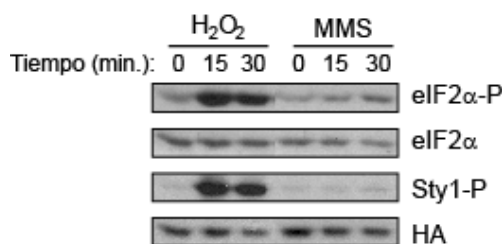


**Figura 19. Estudio del papel de la MAPK Sty1 en la activación de Gcn2 en respuesta al estrés por MMS.** Diferentes cepas de *S. pombe*, se sometieron a tratamiento con  $H_2O_2$  1.5 mM o MMS 0.02%, durante diversos periodos de tiempo y se analizó mediante *Western blot* el estado de fosforilación de eIF2alfa. En la parte superior de la figura aparece el nombre de la cepa utilizada, debajo vemos el tiempo de aplicación del estrés, a la izquierda el tratamiento recibido y a la derecha el nombre del anticuerpo empleado.

## Resultados

Como puede observarse en la figura 19, mientras que la ausencia de Sty1 en presencia de peróxido de hidrógeno conlleva un incremento en la fosforilación de eIF2alfa, la fosforilación de eIF2alfa no aumentó en ausencia de Sty1 cuando las células se sometieron a estrés por exposición a MMS.

A la vista de estos resultados decidimos utilizar la cepa  $\Delta sty1$  que expresa Sty1-HA-6xHis para comprobar si ésta se activaba en respuesta a MMS, comparando los resultados con la respuesta a peróxido de hidrógeno, como control positivo (Figura 20).



**Figura 20. Activación de Sty1 en respuesta a MMS.** Células de *S. pombe* que carecen de la MAPK Sty1, pero que expresan Sty1-HA-6xHis se sometieron a un tratamiento con peróxido de hidrógeno 1.5 mM o a un tratamiento con 0.02% MMS y se recogieron a diferentes tiempos. Se analizó mediante *Western blot* la fosforilación de eIF2alfa y de Sty1, así como la cantidad total de eIF2alfa y de Sty1-HA-6xHis. En la parte superior de la figura se muestra el tipo de tratamiento al que se sometieron las células, debajo el tiempo que estuvieron sometidas a dicho tratamiento y a la derecha de la figura el anticuerpo utilizado.

En la figura se observa que Sty1 sólo se activa tras la exposición a peróxido de hidrógeno, mientras que la exposición a MMS no promueve la activación de Sty1 y su consecuente fosforilación.

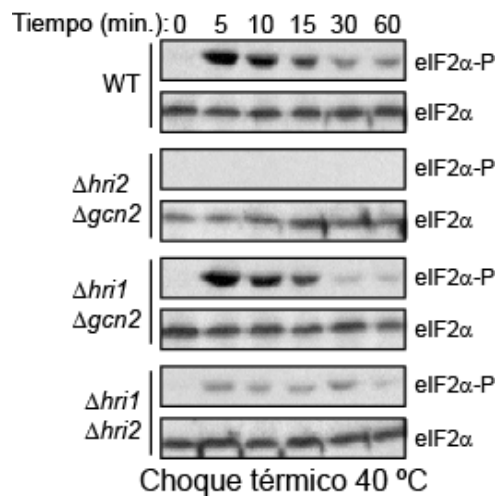
Por tanto, podemos concluir que, a diferencia de lo que sucede en el caso del estrés oxidativo, la exposición a MMS no provoca la activación de Sty1, por lo que no existe una regulación de la actividad eIF2alfa quinasa por parte de Sty1 como respuesta a este tipo de estrés.

### 1.3. Respuesta al choque térmico a 40°C.

La activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a choque térmico fue descrita previamente por Harding y colaboradores en 1999 en células de mamífero (Harding *et al*, 1999). Para estudiar el papel de cada una de las eIF2alfa quinasas de *S. pombe* en la respuesta a choque térmico, se analizó la fosforilación de eIF2alfa en cepas

## Resultados

silvestres y mutantes de delección de dos de las tres eIF2alfa quinasas tras someter a las células a choque térmico a 40°C durante diferentes períodos de tiempo (Figura 21).



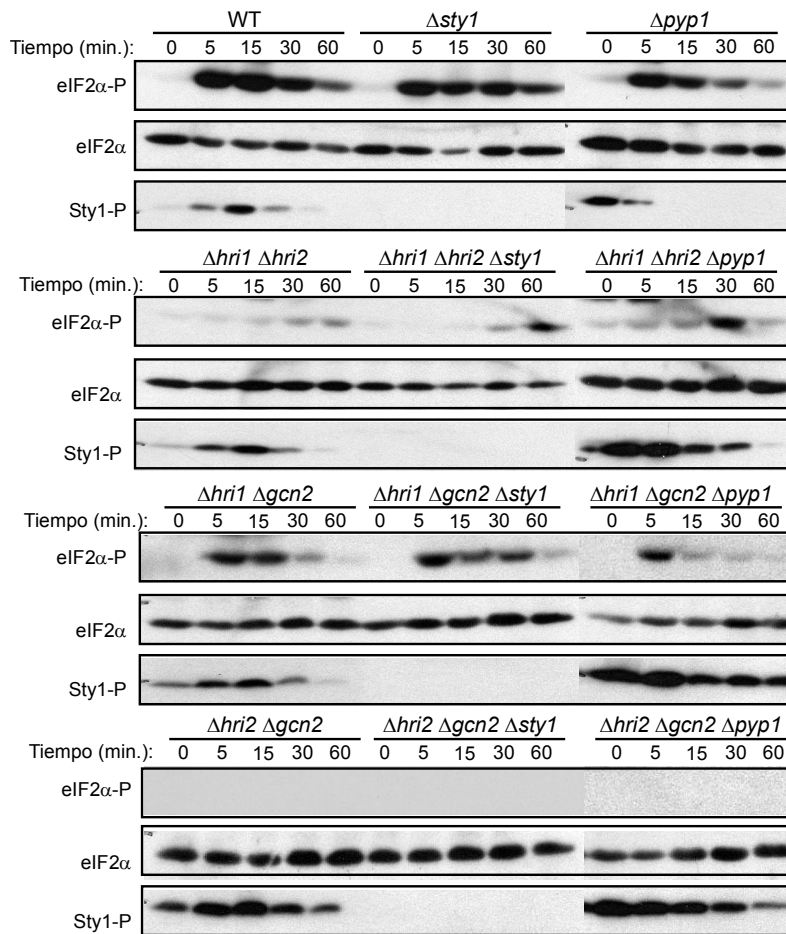
**Figura 21. Activación diferencial de las diferentes eIF2alfa quinasas en respuesta a choque térmico a 40°C.** Diferentes cepas de *S. pombe* se sometieron a choque térmico a una temperatura de 40°C. La fosforilación de eIF2alfa se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. En la parte izquierda de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y a la derecha el anticuerpo utilizado.

Como se observa en la figura, a los 5 minutos de tratamiento la fosforilación del factor eIF2alfa se vio fuertemente incrementada en la cepa silvestre y en la cepa que únicamente expresa la eIF2alfa quinasa Hri2, que mostró un patrón de fosforilación muy similar al de la cepa silvestre en la respuesta a choque térmico. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en la respuesta a estrés oxidativo o por la exposición a MMS, las células que sólo expresan Gcn2 mostraron un incremento muy modesto en la fosforilación del factor eIF2. Por tanto, podemos decir que la principal eIF2alfa quinasa responsable de la respuesta al choque térmico a 40°C es Hri2.

Cuando las células sufren choque térmico se produce la inhibición de la actividad de la fosfatasa Pyp1, lo que conlleva una hiperactivación de Sty1 (Nguyen y Shiozaki, 1999). Para caracterizar el papel de la MAPK Sty1 sobre la fosforilación del factor eIF2 en la respuesta a choque térmico la cepa silvestre, las cepas mutantes de delección de las eIF2alfa quinasas y aquéllas en las que además están delecionados los genes que codifican para Sty1 o para Pyp se sometieron a choque térmico a 40°C (Figura 22).



## Resultados



**Figura 22. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a choque térmico a 40°C. Papel de la MAPK Sty1.** Diferentes cepas de *S. pombe* se sometieron a choque térmico a 40°C durante diferentes períodos de tiempo. La fosforilación de eIF2alfa y de Sty1 se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. En la parte superior de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y los tiempos de tratamiento, y a la izquierda el anticuerpo utilizado.

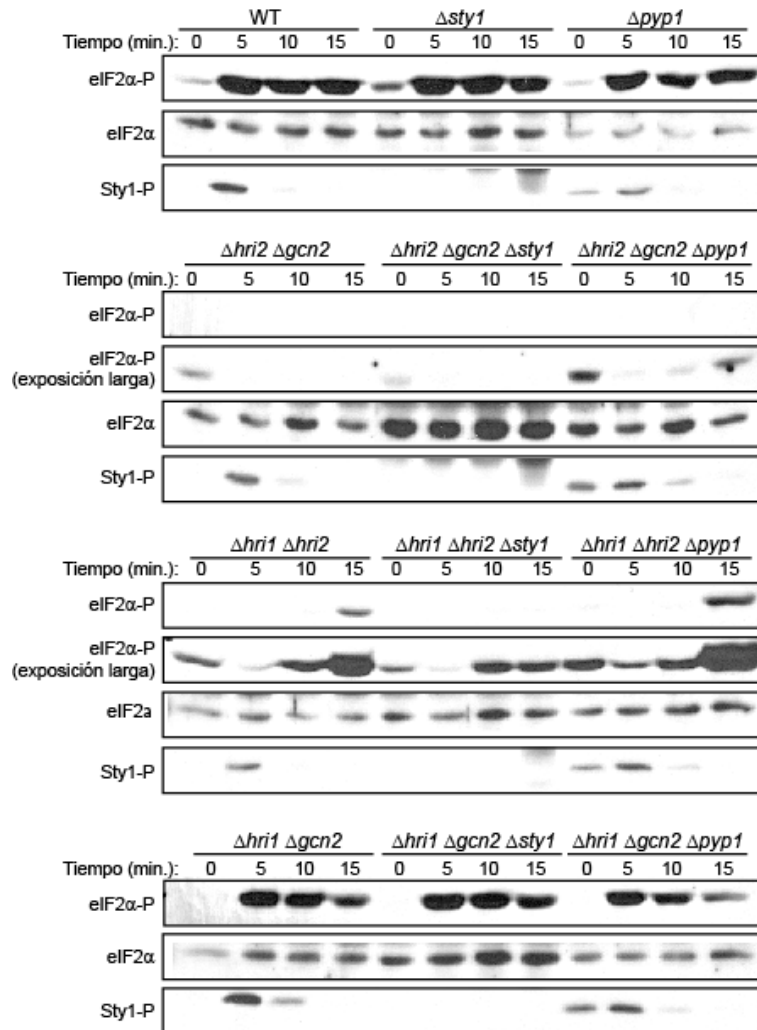
Como ya vimos en la figura 21, la cepa que tan solo tiene Hri2 respondió de un modo muy similar a la cepa silvestre, mientras que en la cepa que sólo expresa Gcn2 la fosforilación de eIF2alfa se incrementó de manera leve y algo más tardía. De nuevo Hri1 no se activó en respuesta a choque térmico a 40°C.

La MAPK Sty1 incrementó su fosforilación a los 5 minutos, alcanzando su máximo nivel a los 15 minutos para decaer a partir de los 30 minutos. A pesar de que en respuesta a este tipo de estrés Sty1 parece activarse fuertemente, esta activación no afectó significativamente a la actividad de las eIF2alfa quinasas, puesto que los niveles de fosforilación de eIF2alfa no se modificaron notablemente ni por la ausencia de Sty1 ni por la ausencia de Pyp1 (Figura 22).



### 1.4. Respuesta al choque térmico a 48°C.

Previamente se había descrito que Hri2 era la primera eIF2alfa quinasa en responder al choque térmico a 48°C, mientras que Gcn2 se activaba a tiempos más largos de tratamiento (Zhan *et al*, 2002). Para caracterizar el papel de cada una de las tres eIF2alfa quinasas de *S. pombe* y el de la MAPK Sty1 en la fosforilación del factor eIF2, sometimos las diferentes cepas de la colección a choque térmico a 48°C durante 5, 10 ó 15 minutos (Figura 23).



**Figura 23. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a choque térmico a 48°C. Papel de la MAPK Sty1.** Diferentes cepas de *S. pombe* se sometieron a choque térmico a 48°C durante distintos periodos de tiempo. La fosforilación de eIF2alfa y de Sty1 se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. En la parte superior de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y los tiempos de tratamiento, y a la izquierda el anticuerpo utilizado.

Como puede verse en la figura, comprobamos que Hri2, al igual que en respuesta a choque térmico a 40°C, es la primera eIF2alfa quinasa en responder a choque térmico a 48°C, pues ya a los 5 minutos de tratamiento pudimos ver un fuerte

incremento de la fosforilación del factor eIF2 en aquellas cepas que sólo expresan esta eIF2alfa quinasa. A tiempos más largos de tratamiento se produjo también la activación de Gcn2, mientras que Hri1 no se activó en respuesta a este tipo de estrés.

A tiempos cortos, 5 minutos de tratamiento, observamos una reducción en los niveles de fosforilación de eIF2alfa en aquellas cepas que carecen de Hri2, ya que dichos niveles de fosforilación fueron inferiores a los observados en ausencia de tratamiento. Este hecho parece sugerir que una eIF2alfa fosfatasa se estaría activando de forma muy temprana como consecuencia del estrés (Figura 23).

La fosforilación de Sty1 se produce de manera muy temprana y transitoria en respuesta al choque térmico a esta temperatura (Nguyen y Shiozaki, 1999). De acuerdo con estos resultados, tan solo pudimos observar fosforilación de Sty1 a los 5 minutos de tratamiento, pues a los 10 minutos ésta desapareció por completo (Figura 23).

Al igual que en el caso del tratamiento por choque térmico a 40°C, a 48°C tampoco observamos diferencias en la fosforilación del factor eIF2alfa en función de la presencia o ausencia de Sty1.

Todos estos datos nos permiten concluir que Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa responsable de la fosforilación del factor eIF2 en respuesta a choque térmico y que, cuando el tratamiento se prolonga en el tiempo, también se activa Gcn2 aunque en menor medida. Además, estos datos sugieren que Sty1 no regula la actividad de las eIF2alfa quinasas durante el estrés por choque térmico.

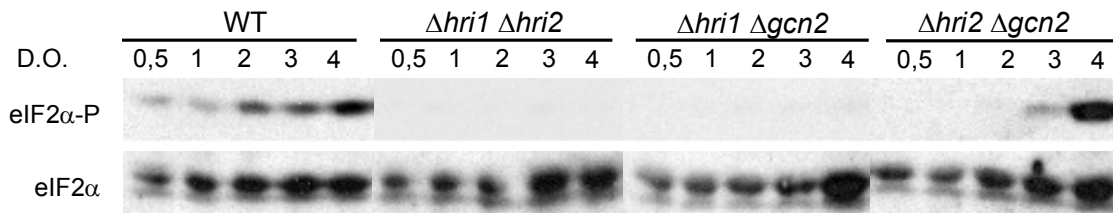
### 1.5. Respuesta al gasto de nutrientes en el medio de cultivo.

Estudios anteriores habían demostrado que la ruta de respuesta a estrés en la que participa Sty1 se activa como consecuencia de la entrada en la fase estacionaria de crecimiento (Zuin *et al*, 2005). Por ello, nos propusimos estudiar si las eIF2alfa quinasas fosforilan al factor eIF2alfa cuando el cultivo alcanza dicha fase estacionaria. Para ello se cultivaron células de la cepa silvestre y células que tan solo expresan una de las tres eIF2alfa quinasas y se recogieron muestras cuando el cultivo alcanzó 0.5, 1, 2, 3 y 4 unidades de densidad óptica a 595 nm (Figura 24).

En la cepa silvestre, cuando el cultivo alcanzó 2 unidades de densidad óptica se observó un incremento en los niveles de eIF2alfa fosforilado, incremento aún mayor cuando el cultivo alcanzó 3 y 4 unidades de densidad óptica. En la cepa que sólo expresa Hri1 el patrón de fosforilación del factor eIF2alfa es muy similar en los puntos de 3 y 4 unidades de densidad óptica, mientras que en las cepas que sólo expresan Hri2 y Gcn2, respectivamente, apenas fosforilan al factor eIF2 en esta situación, lo que nos

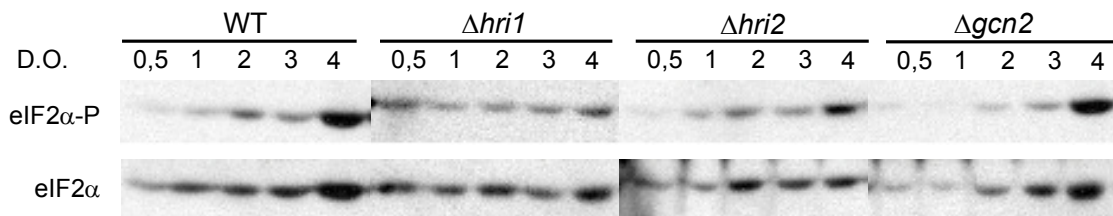
## Resultados

lleva a pensar que Hri1 es la eIF2alfa quinasa responsable de la fosforilación del factor cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento.



**Figura 24. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria.** Se recogieron muestras de las distintas cepas indicadas cuando el cultivo alcanzó las densidades ópticas a 595 nm que aparecen en la figura. La fosforilación de eIF2alfa se analizó en los extractos celulares por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

Para comprobar si efectivamente Hri1 es la principal eIF2alfa quinasa implicada en la fosforilación del factor eIF2alfa cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento, realizamos experimentos similares con cepas mutantes simples de delección de cada una de la eIF2alfa quinasas. Recogimos muestras cuando el cultivo alcanzó diferentes densidades ópticas y analizamos la fosforilación de eIF2alfa por *Western blot* (Figura 25).

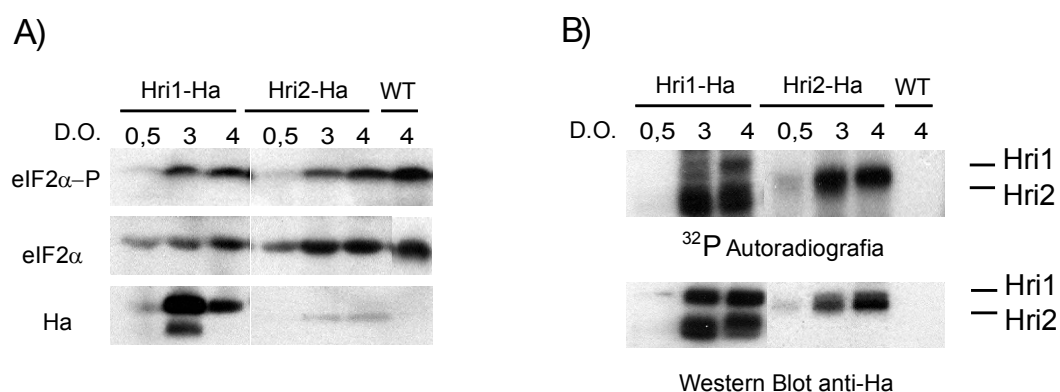


**Figura 25. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria.** Se recogieron muestras de las distintas cepas indicadas cuando el cultivo alcanzó las densidades ópticas a 595 nm que aparecen en la figura. La fosforilación de eIF2alfa se analizó en los extractos celulares por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

Así pudimos observar que el incremento en la fosforilación del factor eIF2 que se produce en la cepa silvestre (WT) se redujo notablemente en la cepa que no expresa Hri1, mientras que en las cepas que no expresan Hri2 o Gcn2, respectivamente, no se observó dicho efecto. Estos resultados sugieren que Hri1 es la principal eIF2alfa quinasa responsable de la fosforilación del factor eIF2 cuando las células entran en fase estacionaria.

## Resultados

A continuación quisimos comprobar si este incremento en los niveles de eIF2alfa fosforilado debido a la actividad de Hri1 y, en menor grado, de Hri2 se debía a un aumento en la cantidad de quinasa o a una mayor actividad de la misma. Para ello, repetimos los experimentos anteriormente descritos utilizando cepas en las cuales Hri1 o Hri2 están etiquetadas con el epítipo HA (Hri1-Ha y Hri2-Ha). Recogimos muestras cuando los cultivos alcanzaron diferentes densidades ópticas y, por un lado, analizamos el posible incremento en la cantidad de las eIF2alfa quinasas en los lisados y, por otro, ensayamos *in vitro* la actividad de dichas quinasas una vez purificadas por inmunoprecipitación (Figura 26).



**Figura 26. Cambios en la expresión y en la actividad de las eIF2alfa quinasas como consecuencia del gasto de nutrientes en el medio de cultivo.** Se recogieron muestras de cultivos de las cepas silvestre (WT), Hri1-Ha y Hri2-Ha a las densidades ópticas indicadas. **A)** Alícuotas de los extractos celulares, se utilizaron para analizar mediante *Western blot* los niveles de fosforilación de eIF2alfa (panel superior) y la cantidad de Hri1 y Hri2 (panel inferior, Ha) presentes en las células en función de la densidad óptica del cultivo. **B)** Alícuotas de los extractos celulares se usaron para inmunoprecipitar Hri1 y Hri2 utilizando anticuerpos anti-Ha. Con los inmunocomplejos obtenidos se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro*. En la parte superior de la figura, se muestra la autofosforilación (<sup>32</sup>P) *in vitro* de Hri1 y de Hri2, y en la parte inferior la cantidad total de ambas en los inmunocomplejos (*Western blot* anti-Ha).

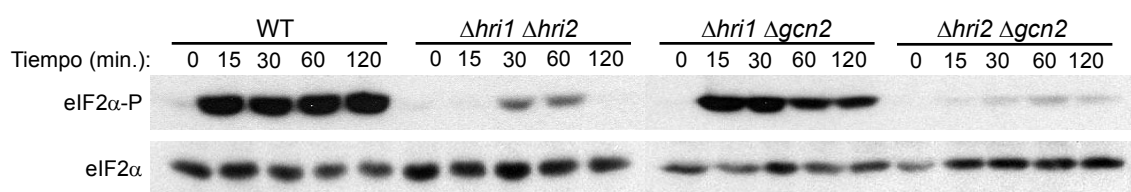
De esta forma se observó que la cantidad de proteína total de ambas eIF2alfa quinasas, Hri1 y Hri2, se incrementó significativamente a medida que aumentaba la densidad óptica del cultivo, sin embargo, el incremento en la cantidad de proteína es considerablemente mayor en el caso de Hri1 (Figura 26A). Los ensayos de actividad *in vitro* mostraron que también la actividad tanto de Hri1 como de Hri2, reflejada en la autofosforilación de las mismas, se incrementó al aumentar la densidad óptica del cultivo (Figura 26B).

### 1.6. Respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio.

Puesto que la entrada de las células en fase estacionaria de crecimiento se debe fundamentalmente a la escasez de nutrientes en el medio de cultivo, siendo los más esenciales las fuentes de carbono, como la glucosa, y las de nitrógeno, decidimos investigar si la ausencia de alguno de ellos conlleva la activación de Hri1, ya que esta proteína quinasa se activa e incrementa su cantidad a medida que las células se aproximan a la fase estacionaria de crecimiento.

#### 1.6.1. Respuesta a la ausencia de glucosa.

Para estudiar el papel de cada eIF2alfa quinasa en respuesta a la ausencia de glucosa en un medio rico, se analizó la fosforilación del factor eIF2alfa en células silvestres y mutantes durante diferentes períodos de tiempo (Figura 27).

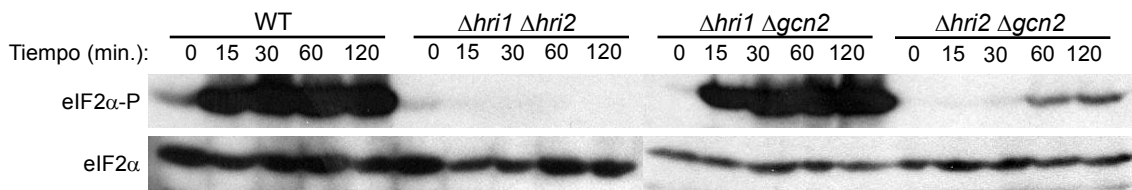


**Figura 27. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de glucosa en medio rico.** Las cepas indicadas en la parte superior de la figura se sometieron a la ausencia de glucosa en medio rico (YE-G). El tiempo de tratamiento se representa en la parte superior de la figura. La fosforilación de eIF2alfa se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

En la cepa silvestre se detectó un fuerte incremento en los niveles de eIF2alfa fosforilado tras 15 minutos en ausencia de glucosa, que se mantuvo al menos hasta las 2 horas de tratamiento. La cepa que únicamente expresa Hri2 mostró un patrón de fosforilación del factor eIF2 muy similar al de la cepa silvestre, mientras que en la cepa que sólo expresa Gcn2 se produce un incremento puntual en la fosforilación del factor entre los 30 y los 60 minutos; en las células que sólo expresan Hri1 el incremento en la fosforilación del factor es mucho más modesto, aunque se mantuvo al menos hasta las dos horas de tratamiento. Estos resultados indican que Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa que interviene en la respuesta a la ausencia de glucosa en el medio de cultivo.

A continuación realizamos el mismo experimento, pero en medio mínimo, en lugar de en medio rico, para que la limitación de glucosa fuera total, aunque añadiendo glicerol al 3 % para evitar el estrés osmótico consecuencia de la ausencia de fuentes de carbono en el medio (Figura 28).

## Resultados

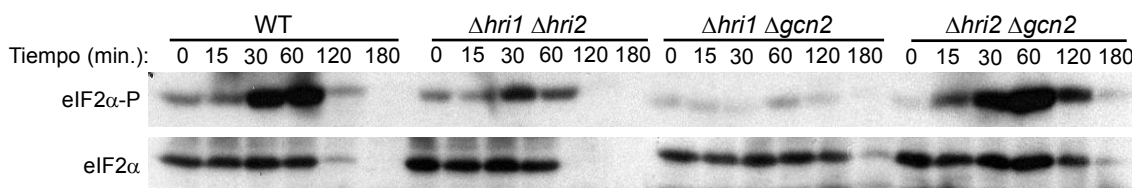


**Figura 28. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de glucosa en el medio mínimo.** Las cepas indicadas en la parte superior de la figura se sometieron a la ausencia de glucosa en medio mínimo suplementado con un 3 % de glicerol (EMM-G). El tiempo de tratamiento se representa en la parte superior de la figura. La fosforilación de eIF2alfa se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

Como se muestra en la figura, en este caso, los resultados indican claramente que Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa que responde a la ausencia de glucosa en el medio. Hri1 contribuye a la respuesta a este tratamiento de manera leve y especialmente a los tiempos más largos, mientras que en estas condiciones parece que Gcn2 no interviene en la fosforilación del factor.

### 1.6.2. Respuesta a la ausencia de nitrógeno.

La activación de Hri1 observada cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria podía deberse a la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo. Por ello, llevamos a cabo experimentos de ausencia de nitrógeno con células silvestres y células que sólo expresan una de las tres eIF2alfa quinasas y analizamos la fosforilación del factor eIF2 (Figura 29).



**Figura 29. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.** Las cepas indicadas en la parte superior de la figura se sometieron a la ausencia de nitrógeno en el medio (EMM-N). El tiempo de tratamiento se representa en la parte superior de la figura. La fosforilación de eIF2alfa se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

Tanto en la cepa silvestre como en la cepa que sólo expresa Hri1 se observó un fuerte incremento en los niveles de fosforilación de eIF2alfa a los 30 minutos de

tratamiento. Los niveles de fosforilación del factor se mantuvieron altos hasta los 120 minutos de tratamiento. Sin embargo, Gcn2 pareció activarse a los 30 minutos, pero su efecto fue más moderado que el de Hri1 y sólo se mantuvo hasta los 60 minutos. Hri2 aparentemente no se activó significativamente en respuesta a esta situación de estrés.

Curiosamente, en todas las cepas hubo una coincidencia en el tiempo entre la caída en la cantidad de eIF2alfa y la caída en la cantidad de eIF2alfa fosforilado, que podría indicar que se estaría activando un proceso de degradación de proteínas como consecuencia de la falta de fuentes de nitrógeno en el medio.

En conjunto todos estos resultados nos sugieren que Hri1 juega un papel importante en la respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo y que se activa a medida que el cultivo entra en fase estacionaria como consecuencia fundamentalmente de la falta de nitrógeno.

Para estudiar la posible participación de Sty1 en la actividad de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, utilizamos cepas que carecen del gen que codifica para Sty1 o del gen que codifica para la fosfatasa Pyp1. Para estudiar el papel regulador de Sty1 sobre cada una de las eIF2alfa quinasas se utilizaron cepas que sólo expresan cada una eIF2alfa quinasa y que además carecen del gen que codifica para Sty1 o del gen que codifica para Pyp1 (Figura 30).

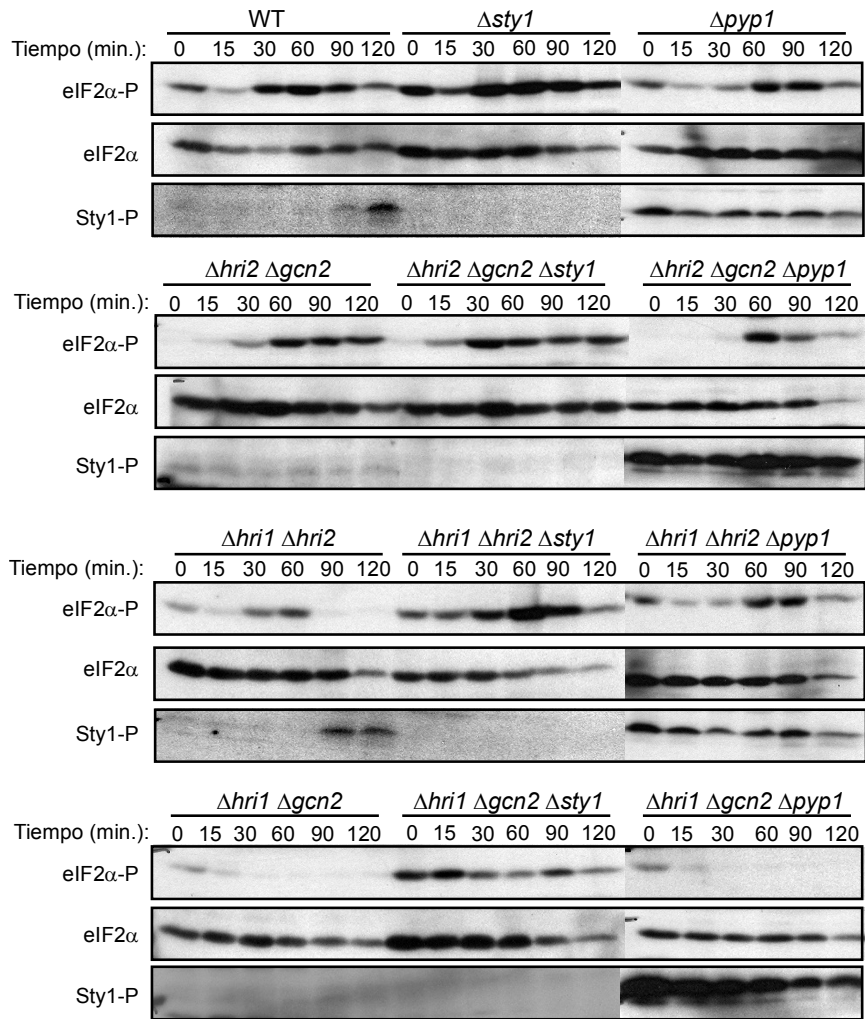
En la figura se observa como la fosforilación del factor eIF2 aumenta significativamente a los 30 minutos de tratamiento en la cepa que expresa Hri1 y en la cepa silvestre; este efecto también se observó en la cepa que sólo expresa Gcn2, aunque en menor grado. En la cepa que sólo expresa Hri2 no se observó un incremento en los niveles de eIF2alfa fosforilado.

En todos los casos, la fosforilación del factor eIF2 aumentó cuando en las cepas estaba delecionado el gen que codifica para Sty1. Cuando se delecionó el gen que codifica para Pyp1 la fosforilación del factor eIF2alfa fue menor en respuesta a la ausencia de nitrógeno, que en las cepas que sí expresan dicha fosfatasa. Estos datos sugieren que Sty1 juega un papel importante como regulador negativo de la actividad eIF2alfa quinasa en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio.

Es interesante señalar que, cuando las células permanecían en ausencia de nitrógeno, los niveles de Sty1 fosforilado sólo aumentaban en aquellas células que expresan Gcn2. Además, los niveles de eIF2alfa fosforilado disminuyen cuando los niveles de Sty1 fosforilado aumentan en dichas cepas.



## Resultados



**Figura 30. Activación diferencial de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Papel de la MAPK Sty1.** Diferentes cepas de *S. pombe* se sometieron a privación de nitrógeno en el medio de cultivo durante diferentes períodos de tiempo, según se indica en la parte superior. La fosforilación de eIF2alfa y de Sty1 se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. En la parte superior de la figura aparece el nombre de la cepa ensayada y a la izquierda el anticuerpo utilizado.

Estos resultados sugieren que existe una interacción entre la ruta de activación de Sty1 y la de activación de las eIF2alfa quinasas en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio, ya que Sty1 sólo se activa cuando Gcn2 está presente en las células y dicha activación coincide con el descenso en los niveles de eIF2alfa fosforilado. Por otro lado, la ausencia de Sty 1 en las células parece favorecer la activación de las tres eIF2alfa quinasas en respuesta a la escasez de fuentes de nitrógeno.

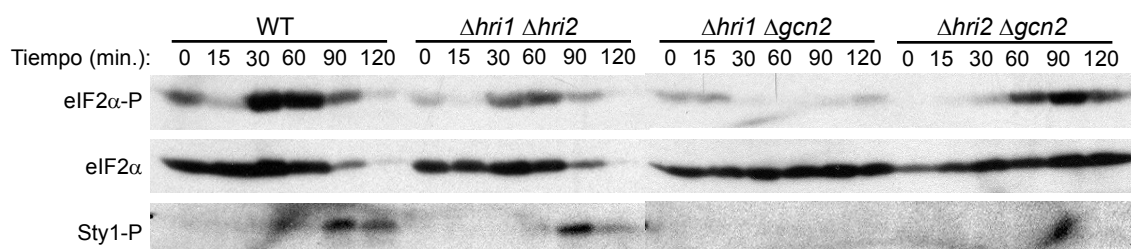
Los resultados mostrados en la figura 30 sugieren que la activación de Gcn2 en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo promueve una activación de Sty1, ya que esta MAPK no se fosforila en células que carecen de Gcn2, al menos hasta las 2 horas



## Resultados

de tratamiento. Petersen y Nurse en 2007 describieron que Gcn2 actuaría como modulador de la señal de TOR, regulando los niveles de la fosfatasa Pyp2 y activando Sty1 (Petersen y Nurse, 2007).

Por todo ello, decidimos estudiar, utilizando sólo dobles mutantes de delección de las eIF2alfa quinasas, la activación de Sty1 y corroborar la relación entre la actividad de Gcn2 y la activación de Sty1 (Figura 31).



**Figura 31. Estudio de la activación de Sty1 en función de la presencia o ausencia de Gcn2.** Las cepas de *S. pombe* indicadas en la parte superior de la figura se mantuvieron en ausencia de nitrógeno durante los tiempos indicados. La fosforilación de eIF2alfa y de Sty1 se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos.

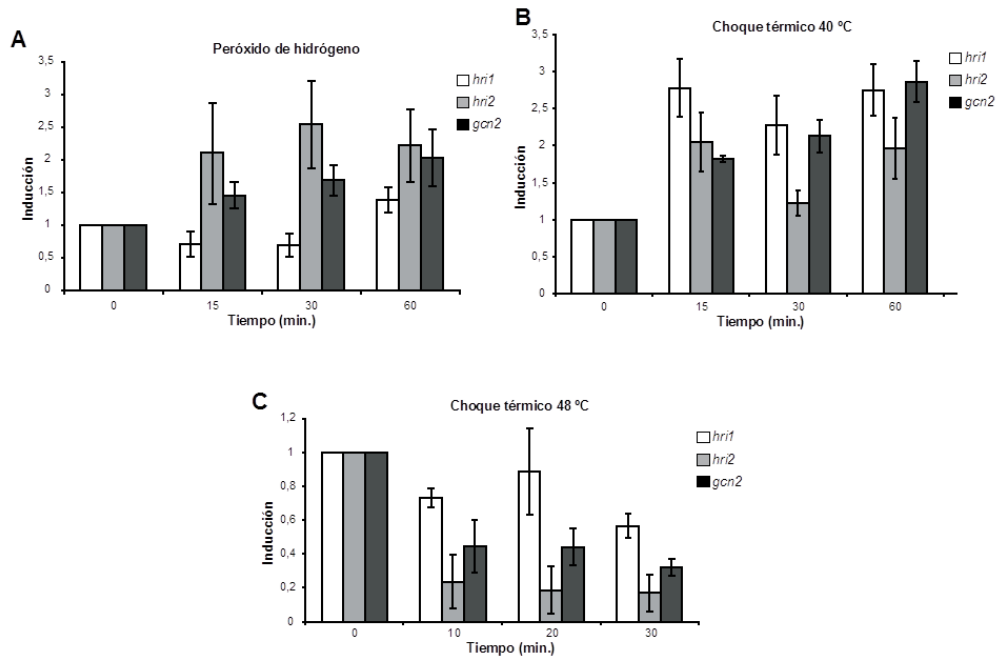
Sólo en la cepa silvestre y en aquélla que únicamente expresa Gcn2, se produjo un aumento en la fosforilación de Sty1 cuando las células permanecieron durante 90 minutos en ausencia de nitrógeno; sin embargo, en aquellas células que no expresan Gcn2, a pesar de incrementar significativamente la fosforilación de eIF2alfa (cepa  $\Delta hri2\Delta gcn2$ ), a las 2 horas de tratamiento todavía no se ha producido la fosforilación de Sty1. Por tanto, nuestros resultados parecen indicar que la activación de Gcn2 promueve y es necesaria para la activación de Sty1 y que, a su vez, dicha activación regula negativamente la respuesta de las eIF2alfa quinasas a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

### 1.7. Regulación de la expresión génica de las eIF2alfa quinasas durante el estrés oxidativo y el choque térmico.

Una vez que conocimos la respuesta de cada una de las eIF2alfa quinasas en condiciones de estrés oxidativo y de choque térmico, nos preguntamos si existen cambios en los niveles de transcripción y de traducción de estas proteínas como consecuencia de la aplicación de estos tipos de estrés.

## Resultados

Para observar si se producen cambios en la cantidad de los ARNm de las eIF2alfa quinasas en respuesta al estrés, utilizamos cepas silvestres y cuantificamos, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, cada uno de los ARNm (Figura 32).



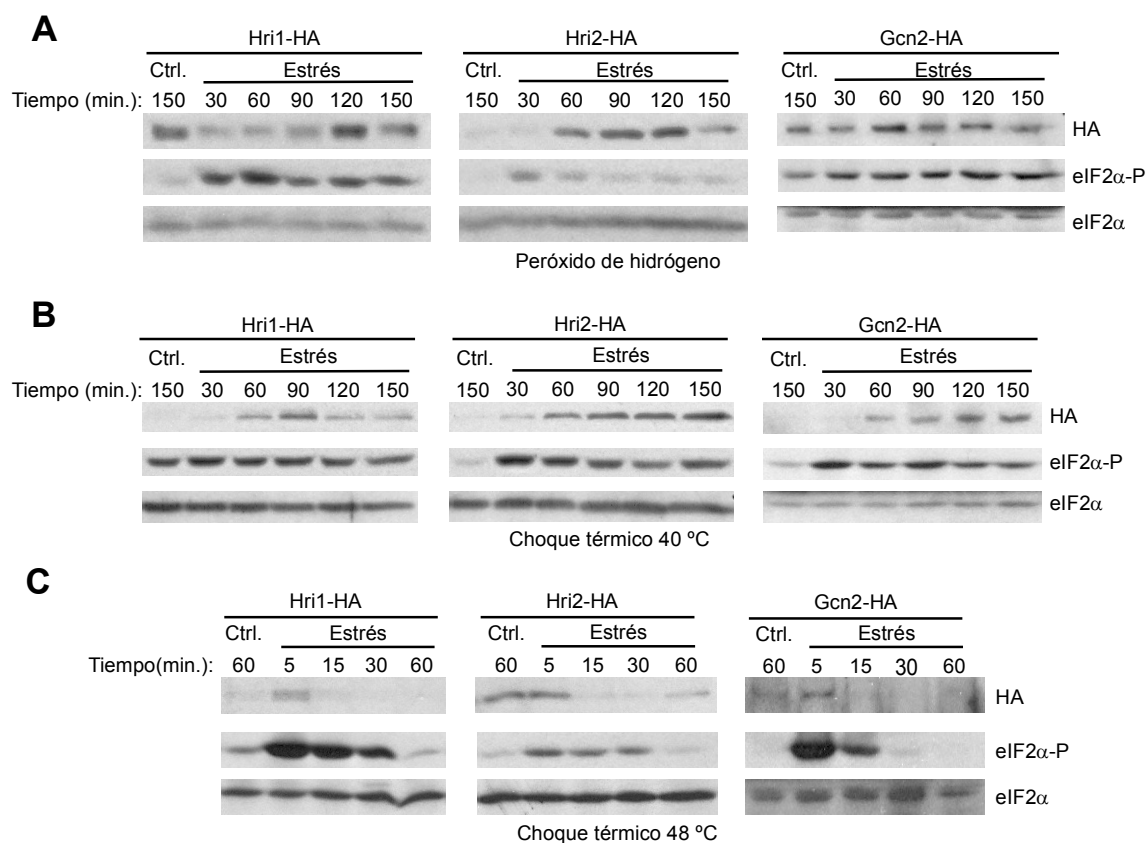
**Figura 32. Cambios en la cantidad de mRNA de las diferentes eIF2alfa quinasas en respuesta a diferentes tipos de estrés.** Se llevaron a cabo tratamientos de estrés oxidativo (A), choque térmico a 40°C (B) o a 48°C (C) durante diferentes períodos de tiempo según se indica en la figura. Se representa la variación en la cantidad de ARNm en relación con el tiempo transcurrido de tratamiento. En la parte superior de la figura aparece el tipo de estrés aplicado a las células. Los niveles de los distintos ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los valores mostrados indican la variación en los niveles de ARNm en células tratadas con respecto a los niveles presentes en células sin tratar (control), dando a estos últimos el valor 1.

Los resultados indican que se produjo una inducción de la síntesis de los ARN mensajeros de los genes *hri2* y *gcn2* cuando las células fueron sometidas a estrés oxidativo o a choque térmico a 40°C. También vemos cómo, por el contrario, se produjo una disminución en la cantidad de los ARNm de estos genes cuando realizamos un tratamiento de choque térmico a 48°C. En cuanto a los niveles de ARNm del gen *hri1*, observamos un fuerte incremento al someter a las células a choque térmico a 40°C y una pequeña reducción cuando aplicamos estrés oxidativo o choque térmico a 48°C.

A continuación estudiamos si se producen cambios en la cantidad de proteína de las distintas eIF2alfa quinasas, como consecuencia de la aplicación de los mismos tipos

## Resultados

de estrés, que se pueda correlacionar con los cambios en la cantidad de sus ARNm. Para ello utilizamos 3 cepas de *S. pombe*, cada una de las cuales presenta una de las eIF2alfa quinasas marcada con el epítipo HA. Después de aplicar los diferentes tipos de estrés durante distintos periodos de tiempo, se analizó la cantidad de cada proteína en las células (Figura 33).



**Figura 33. Estudio del efecto de distintos tipos de estrés en la cantidad de las eIF2alfa quinasas.** Cepas de *S. pombe* que presentan el epítipo HA marcando cada una de las eIF2alfa quinasas, fueron sometidas a estrés oxidativo (A), choque térmico a 40°C (B) o a 48°C (C) durante diferentes periodos de tiempo. La cantidad de cada una de las eIF2alfa quinasas marcadas con el epítipo HA se estudió en los extractos celulares por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HA. También se analizó por *Western blot* la activación de las eIF2alfa quinasas utilizando anticuerpos fosfoespecíficos (eIF2alfa-P).

Como se aprecia en la figura, los cambios en la cantidad de proteína de cada una de las eIF2alfa quinasas se produjeron de manera muy similar a lo ocurrido con la cantidad de ARNm, de manera que la cantidad de proteína y de ARNm correlacionan de manera muy aproximada para cada tipo de estrés. Sin embargo, la inducción de la fosforilación del factor eIF2 es un evento temprano que no parece estar directamente relacionado con estos cambios en la expresión génica.

## 2. Implicación de las eIF2alfa quinasas en la modulación del ciclo celular de *S. pombe* en situaciones de privación de nitrógeno.

### 2.1. Estudio de la parada del ciclo celular en la fase G1.

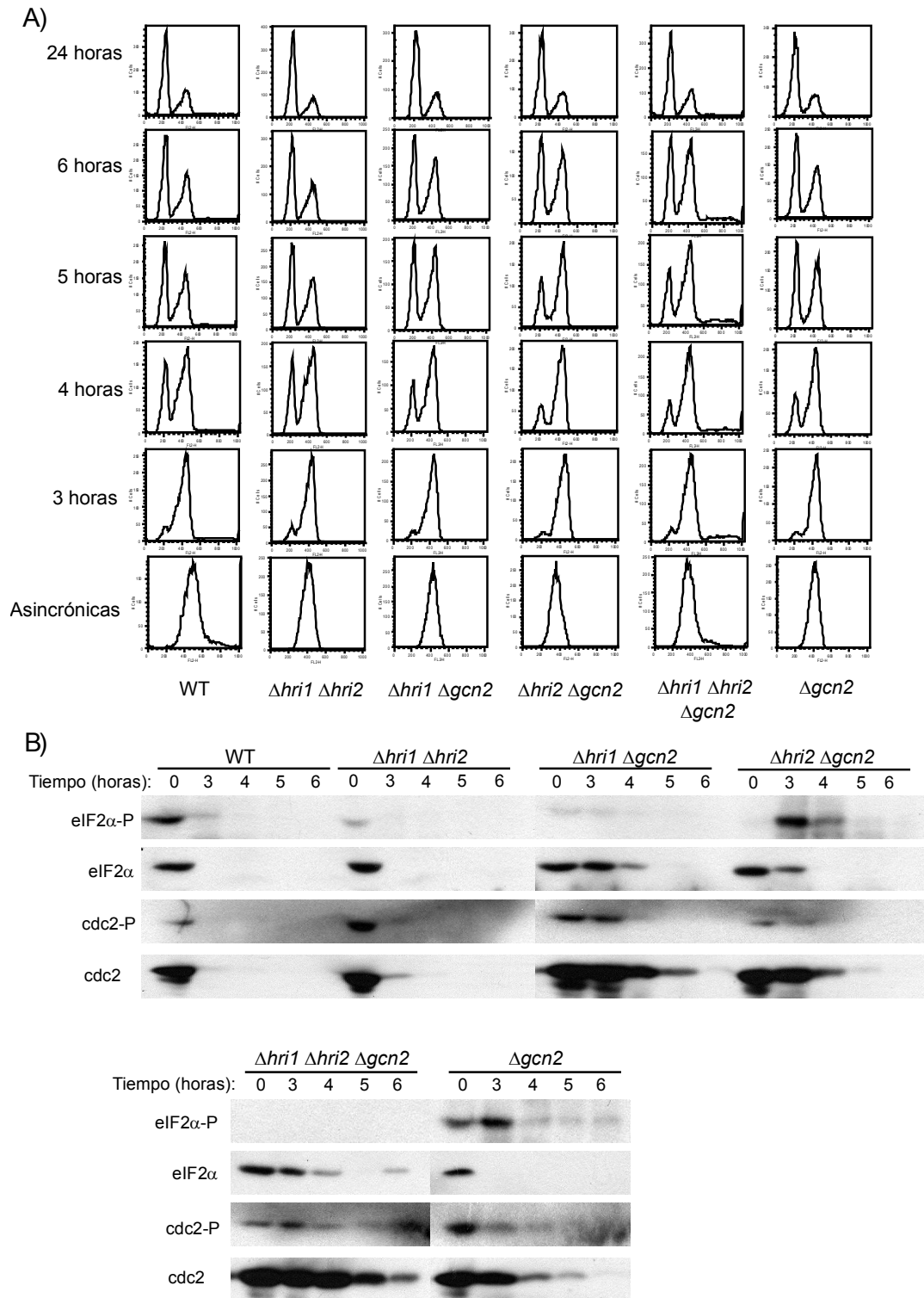
Resultados previos (Tvegard *et al*, 2007) describían la necesidad de la presencia de Gcn2 en las células de *S. pombe* para que se produjese un retardo en la entrada en el ciclo celular en presencia de algunos agentes genotóxicos, tras haberlas detenido en la fase G1.

Petersen y Nurse, en 2007, describieron una relación entre la activación de Gcn2 y la activación de Sty1 que conduciría a una aceleración en la entrada en mitosis de las células cuando se inhibe la ruta de Tor1 en *S. pombe*. Puesto que nuestros resultados parecían indicar que Gcn2 es necesaria para la activación de Sty1 cuando sometemos a las células a ausencia de nitrógeno en el medio, nos propusimos comprobar si alguna de las tres eIF2alfa quinasas de *S. pombe* jugaba un papel modulador en la parada en la fase G1 del ciclo celular como consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

Para ello, células de la cepa silvestre, de las cepas que sólo expresan una de las tres eIF2alfa quinasas, de la cepa que no expresa ninguna eIF2alfa quinasa y de la cepa que no expresa Gcn2 se mantuvieron en medio mínimo sin nitrógeno (EMM-N) durante 24 horas, tomando muestras de las mismas a distintos tiempos para analizar, por una parte, su contenido en ADN y, por otra, el estado de fosforilación de eIF2alfa y Cdc2. Tanto el contenido de ADN como el estado de fosforilación de Cdc2 se utilizaron como indicadores del punto del ciclo celular en que se encuentran las células (Figura 34).

Como muestran los histogramas de citometría de flujo, en aquellas cepas que no expresan Gcn2 pudimos observar un evidente retraso en la parada del ciclo celular en G1 (contenido 1N de ADN) respecto a la cepa silvestre o a la que sólo expresa Gcn2 (Figura 34A). Es decir, aunque estas células pudieron detener el ciclo celular en la fase G1, mostraron un retraso en la parada del ciclo celular que se evidenció, fundamentalmente a las 4, 5 y 6 horas de incubación en un medio sin nitrógeno, por un mayor número de células con un contenido 2N de ADN.

## Resultados



**Figura 34. Implicación de las eIF2alfa quininas en la regulación del ciclo celular en condiciones de ausencia de nitrógeno.** Diversas cepas de *S. pombe*, incluyendo la cepa salvaje y distintos mutantes de delección, según se indica, se mantuvieron en ausencia de nitrógeno con el fin de provocar la parada del ciclo celular en la fase G1. **A)** A los tiempos indicados, las células se fijaron en etanol y fueron analizadas utilizando técnicas de citometría de flujo para, analizando el contenido de ADN, determinar fase del ciclo celular en que se encontraban. **B)** Extractos celulares correspondientes a las mismas cepas y tiempos de tratamiento del apartado **A**, se utilizaron para analizar mediante *Western blot* la fosforilación de eIF2alfa y de Cdc2, así como la cantidad total de estas proteínas.

Resulta llamativo que en aquellas células que no expresan ni Gcn2 ni Hri1, es decir, cepas que sólo expresan Hri2 o no expresan ninguna de las tres eIF2alfa quinasas, el retraso en la parada del ciclo celular fue aún más evidente. En estas células no se produce la fosforilación de eIF2alfa como consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo puesto que carecen de Hri1 y de Gcn2, que como vimos anteriormente son las eIF2alfa quinasas que se activan en respuesta a este estrés, por lo que parece determinante dicha activación para una adecuada parada del ciclo celular en estas condiciones.

En la figura 34B observamos como a partir de las 3 horas de tratamiento la cantidad total de Cdc2 y de eIF2alfa disminuyó de forma muy acusada en las células de la cepa silvestre y de la cepa que sólo expresa Gcn2. Sin embargo, en las cepas que no expresan Gcn2 el proceso de degradación de proteínas se retrasó en el tiempo con respecto a las primeras. En aquellas células que sólo expresan Hri2 o que no expresan ninguna de las tres eIF2alfa quinasas este retraso fue aún mayor. Estos resultados indican que, como consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, se estaría produciendo una degradación de proteínas celulares y que la fosforilación de eIF2alfa por Gcn2 sería un proceso implicado en promover dicha degradación.

### **2.2. Estudio de la cinética de crecimiento de *S. pombe*.**

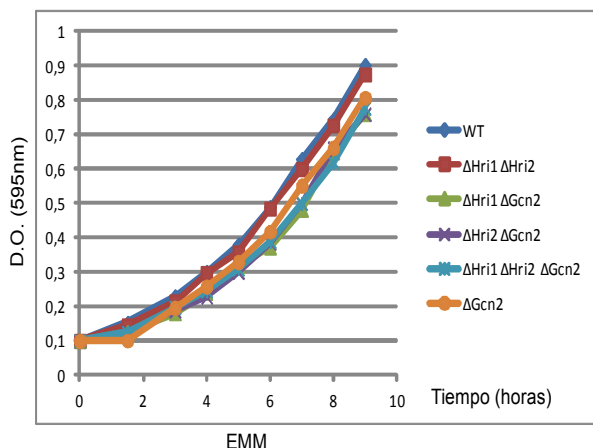
Puesto que los resultados anteriormente descritos sugieren que la presencia de Gcn2 es importante para la regulación del ciclo celular en condiciones de ausencia de nitrógeno, nos planteamos la posibilidad de que las células que carecen de Gcn2 presentasen alguna alteración en su capacidad de crecimiento en esa situación. Para estudiar si Gcn2 o alguna de las otras dos eIF2alfa quinasas de *S. pombe* están implicadas en la duración del ciclo celular en presencia o ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, se realizaron curvas de crecimiento con la cepa silvestre y con las cepas mutantes en las distintas eIF2alfa quinasas. Las células se cultivaron en medio mínimo y en medio mínimo sin nitrógeno, y se midió la densidad óptica de los cultivos cada dos horas para determinar si existían variaciones en el crecimiento de las células (Figura 35).

En la figura puede observarse como en medio mínimo no existieron diferencias significativas en la velocidad de división de los distintos tipos de células (Figura 35A). Sin embargo, cuando retiramos el nitrógeno del medio de cultivo, aquellas cepas que carecen de Gcn2 muestran un retraso en su ritmo de división de aproximadamente 2 horas respecto a las cepas que tienen Gcn2 (Figura 35B). Estos datos sugieren que la duración del ciclo celular en ausencia de nitrógeno en aquellas cepas que carecen de Gcn2 es mayor que en aquellas cepas que expresan dicha quinasa. La activación de

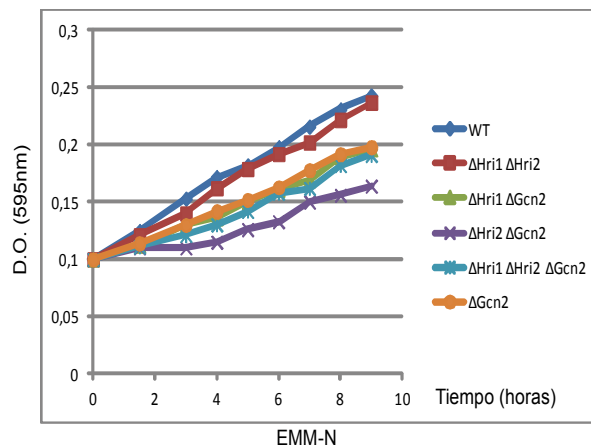
## Resultados

Gcn2 estaría promoviendo que las células avancen en el ciclo celular, probablemente con el fin de alcanzar antes la fase G1 y favorecer la parada del ciclo celular en dicha fase como mecanismo de defensa ante la ausencia de nitrógeno.

**A**



**B**

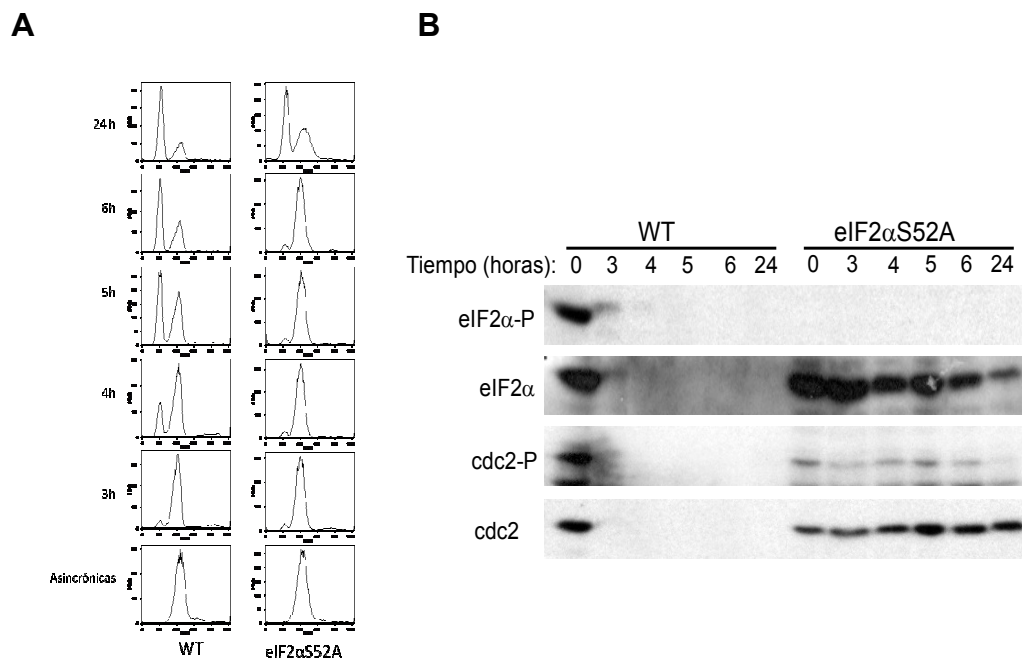


**Figura 35. Efecto de la delección de las eIF2alfa quinasas en la velocidad de división de las células de *S. pombe* en ausencia de nitrógeno.** Cultivos de las cepas de *S. pombe* que se indican en la figura se incubaron hasta alcanzar 0.25 unidades de densidad óptica a 595 nm en EMM. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio EMM (A) o en medio EMM-N (B), diluyéndolas hasta 0.1 unidades de densidad óptica. Los gráficos representan los valores de densidad óptica a 595 nm obtenidos a los distintos tiempos de incubación, según se indica.

### 2.3. Estudio del efecto de la fosforilación del factor eIF2 en la parada del ciclo celular en la fase G1.

Puesto que en aquellas cepas que no expresan ni Hri1 ni Gcn2 y, por tanto, no fosforilan al factor eIF2 en ausencia de nitrógeno en el medio, observamos un retraso evidente en la parada del ciclo celular en G1, decidimos estudiar si la fosforilación del factor es necesaria para que las células de *S. pombe* paren el ciclo celular a tiempo en ausencia de nitrógeno. Para ello utilizamos una cepa que expresa una subunidad alfa del factor eIF2 en la que la serina 52 se ha mutado por una alanina y, por tanto, no se puede fosforilar por las eIF2alfa quinasas (cepa eIF2 $\alpha$ S52A). Células de la cepa silvestre y de la cepa eIF2 $\alpha$ S52A se mantuvieron en medio mínimo sin nitrógeno (EMM-N) durante 24 horas, tomando muestras de las mismas a distintos tiempos para analizar, por una parte, su contenido en ADN y, por otra, el estado de fosforilación de eIF2alfa y Cdc2. Tanto el contenido de ADN como el estado de fosforilación de Cdc2 se utilizaron como indicadores del punto del ciclo celular en que se encuentran las células (Figura 36).





**Figura 36. Implicación de la fosforilación de eIF2alfa en la regulación del ciclo celular en condiciones de ausencia de nitrógeno.** Células de la cepa salvaje (WT) y de la cepa eIF2αS52A de *S. pombe* se mantuvieron en ausencia de nitrógeno con el fin de provocar la parada del ciclo celular en la fase G1. **A)** A los tiempos indicados, las células se fijaron en etanol y fueron analizadas utilizando técnicas de citometría de flujo para, analizando el contenido de ADN, determinar fase del ciclo celular en que se encontraban. **B)** Extractos celulares correspondientes a las mismas cepas y tiempos de tratamiento del apartado **A**, se utilizaron para analizar mediante *Western blot* la fosforilación de eIF2alfa y de Cdc2, así como la cantidad total de estas proteínas.

En los histogramas obtenidos por citometría de flujo observamos un importante retraso en la parada del ciclo celular en G1 en la cepa eIF2αS52A. A las 4, 5 y 6 horas de tratamiento el pico correspondiente al número de células detenidas en G1 es mucho más elevado en la cepa silvestre que en la cepa cuyo eIF2 no es fosforilable (Figura 36A). En la figura 36B se muestra como en la cepa eIF2αS52A la cantidad total de proteínas eIF2alfa y Cdc2 apenas disminuyó tras 24 horas en condiciones de ausencia de nitrógeno, mientras que en la cepa silvestre, la cantidad total de esas proteínas se redujo de manera drástica ya a las 3 horas de tratamiento.

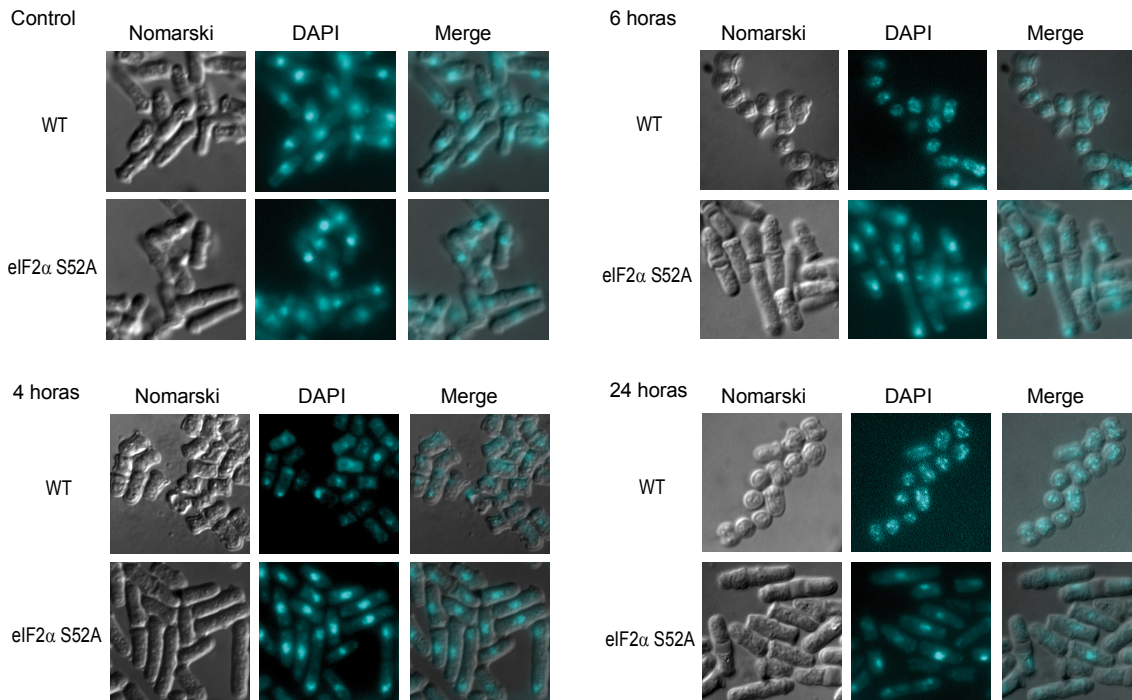
Estos datos nos indican que la fosforilación del factor eIF2 podría ser necesaria para que las células de *S. pombe* paren el ciclo celular a tiempo en condiciones de ausencia de nitrógeno y, también, para que se produzca una degradación de las proteínas celulares que podría ser esencial para promover la parada del ciclo en la fase G1.

Cuando las células de *S. pombe* se cambian de unas condiciones de disponibilidad de nitrógeno a una situación de privación de nitrógeno, dichas células avanzan en mitosis y se dividen a un menor tamaño (Petersen y Nurse, 2007). Puesto



## Resultados

que las células cuyo eIF2 no es fosforilable presentan un retraso evidente en la parada del ciclo celular en G1 en ausencia de nitrógeno, nos propusimos evidenciar si las células de esta cepa presentan diferencias morfológicas con las células de la cepa silvestre tras someterlas a estrés por ausencia de nitrógeno (Figura 37).



**Figura 37. Estudio de la relación entre la fosforilación del factor eIF2 y los cambios morfológicos que sufren las células de *S. pombe* como consecuencia de la ausencia de nitrógeno.** Cultivos de células de *S. pombe* de la cepa salvaje y de aquella que presenta un eIF2 no fosforilable a densidad óptica de 0,25 unidades a 595 nm se cambiaron de medio EMM a medio EMM-N. Las células se mantuvieron durante diferentes tiempos, según se indica, en ausencia de nitrógeno y se fijaron con etanol. Posteriormente, se fijaron por calor a un porta y los núcleos se tiñeron con DAPI tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se muestran fotografías representativas de los cultivos tanto con luz transmitida por el sistema Nomarski, como mediante microscopía de fluorescencia para observar los núcleos teñidos con DAPI.

Como se observa en la figura, las células de la cepa silvestre disminuyeron su tamaño y se redondearon a medida que aumentó el tiempo de tratamiento; además, al teñir los núcleos, observamos una fragmentación del material genético. Sin embargo, en la cepa cuyo eIF2 no puede fosforilarse, tanto el tamaño como la forma de las células apenas variaron a lo largo del tratamiento; además la estructura del núcleo se mantuvo prácticamente invariable durante las 24 horas en que las células fueron sometidas al tratamiento de ausencia de nitrógeno.

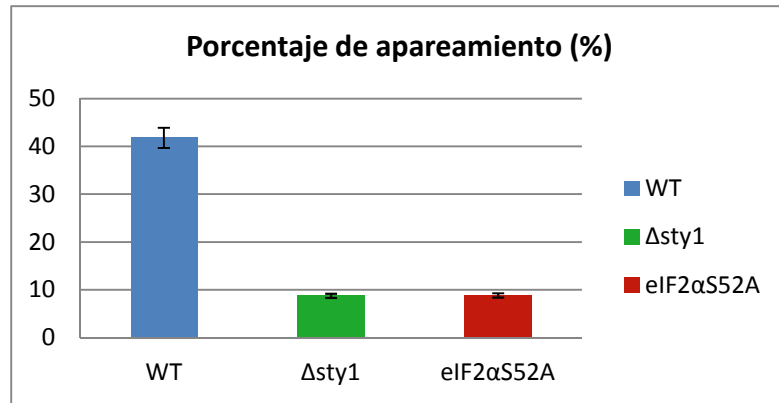
Todos estos resultados sugieren que la fosforilación del factor eIF2 es necesaria para que las células detengan a tiempo su ciclo celular en la fase G1, se produzcan los cambios morfológicos y los procesos de degradación de proteínas, como consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

### **2.4. Estudio del efecto de la fosforilación del factor eIF2 en la diferenciación sexual.**

Cuando las células de *S. pombe* se encuentran en ausencia de nitrógeno detienen su ciclo celular en G1 y, si están presentes células de los dos tipos sexuales, inician una diferenciación sexual y se produce el apareamiento. Este apareamiento conduce a la formación de cigotos que, seguidamente, inician el proceso de meiosis (Yamamoto, 1996). Sty1 fosforila al factor de transcripción Atf1, que, a su vez, regula al factor de transcripción Ste11, necesario para la diferenciación sexual de las células de *S. pombe* (Shiozaki y Russell, 1996). Las células que carecen de Ste11 son totalmente estériles, mientras que aquellas que carecen de Sty1 presentan un porcentaje de apareamiento muy bajo.

Nuestros resultados parecen indicar que la fosforilación del factor eIF2 por Gcn2, en situaciones de privación de nitrógeno, está modulando la activación de Sty1. Además, muestran que aquellas cepas que presentan un eIF2 no fosforilable no llevan a cabo adecuadamente la parada del ciclo celular en G1 como consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio. Estos datos podrían estar indicando una participación de la fosforilación del factor eIF2 en la diferenciación sexual de las células a través de su efecto sobre la parada del ciclo celular en G1 y de su efecto sobre la activación de Sty1. Por ello, analizamos la capacidad de apareamiento de la cepa eIF2 $\alpha$ S52A, comparándola con la capacidad de apareamiento de las células de una cepa silvestre y de una cepa que no expresa Sty1. Mediante cruces genéticos obtuvimos cepas homotáticas h<sup>90</sup> de los tipos mencionados en las que indujimos la diferenciación sexual, para posteriormente contar cigotos, tétradas y células sin aparear, y calcular el porcentaje de apareamiento para cada una de las cepas (Figura 38).

La cepa silvestre mostró un porcentaje de apareamiento de un 40% aproximadamente, mientras que en la cepa que no expresa Sty1 y en aquella que expresa un eIF2 $\alpha$  no fosforilable en la serina 52 el porcentaje de apareamiento fue inferior al 10%. Este dato indica que la cepa en la cual no se fosforila el factor eIF2 es parcialmente estéril. Por tanto la fosforilación del factor eIF2 parece ser un proceso necesario para la parada del ciclo celular en G1 y para la diferenciación sexual de las células en situaciones de ausencia de nitrógeno en el medio.



**Figura 38. Estudio de la capacidad de apareamiento de las células que expresan un factor eIF2alfa no fosforilable.** En la figura se representa el porcentaje de apareamiento alcanzado por las cepas homotáticas silvestre (WT), mutante de delección de Sty1 ( $\Delta sty1$ ) y cepa con el eIF2 no fosforilable (eIF2 $\alpha$ S52A), tras 48 horas de incubación en medio MEA a 25° C.

### 3. Implicación de las eIF2alfa quinasas en la capacidad de supervivencia de las células de *S. pombe* en respuesta a diferentes situaciones de estrés.

Puesto que los resultados anteriores parecen indicar que Gcn2 podría tener un papel importante en la regulación del ciclo celular en *S. pombe*, nos propusimos investigar si la presencia de ésta o de alguna de las otras eIF2alfa quinasas es necesaria para el crecimiento de las células en diferentes situaciones de estrés.

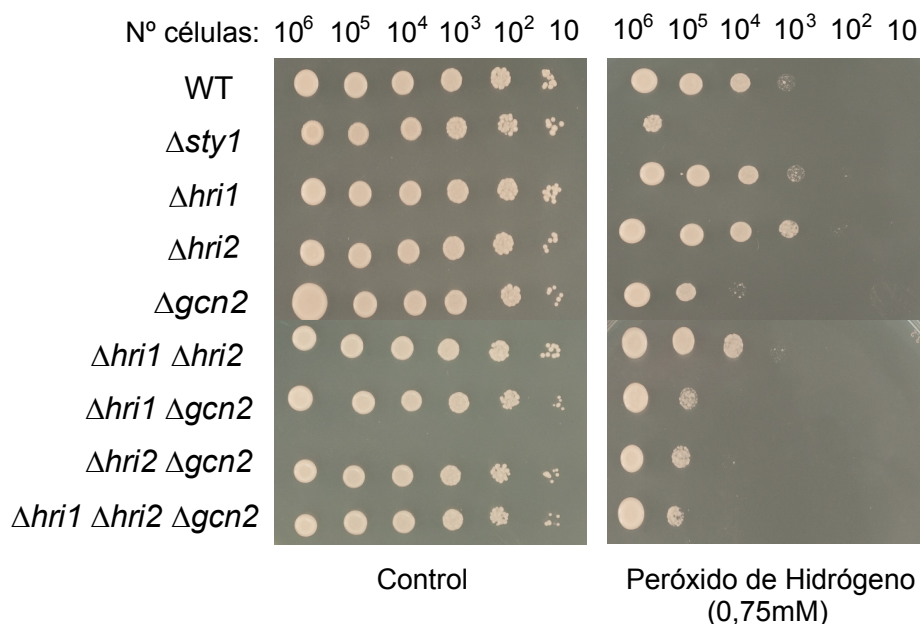
#### 3.1. Estrés oxidativo.

Ensayamos la supervivencia de cepas mutantes que expresan dos, una o ninguna de las tres eIF2alfa quinasas en condiciones de estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en placa utilizando medio mínimo (EMM), ya que en experimentos previos similares en medio rico (YES) no habíamos encontrado diferencias en la supervivencia al estrés entre la cepa silvestre y las cepas mutantes en las distintas eIF2alfa quinasas.

En condiciones de estrés oxidativo, el crecimiento de todas las cepas se vio notablemente afectado, si bien en la cepa que carece de Sty1, como esperábamos, la viabilidad celular se mostró gravemente comprometida. Así mismo, el crecimiento de todas las células que carecen de Gcn2 se vio significativamente disminuido respecto a la cepa silvestre y a las que carecen de las otras eIF2alfa quinasas (Figura 39). Es decir, la ausencia de Gcn2 afecta a la capacidad de supervivencia de las células en presencia de peróxido de hidrógeno en el medio, mientras que la ausencia de Hri1, de Hri2 o de ambas no parece tener ninguna influencia. Estos resultados sugieren que la presencia de

## Resultados

Gcn2 y la de Sty1, pero no la de Hri1 y Hri2, son necesarias para la supervivencia de las células de *S. pombe* en condiciones de estrés oxidativo.



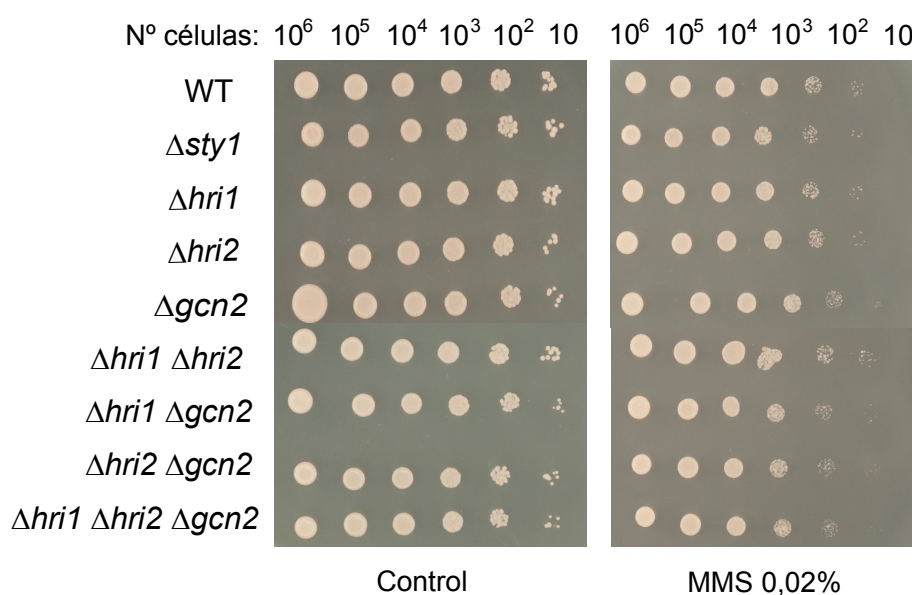
**Figura 39. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad celular en *S. pombe*.** Diluciones seriadas de cultivos de *S. pombe* de distintas cepas se sembraron por goteo sobre placas de medio EMM-Agar y se incubaron a 32°C en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno 0.75 mM durante 72 horas, según se indica en la figura. En la parte izquierda de la figura aparecen los nombres de las cepas empleadas en el ensayo y en la zona superior el número de células sembrado.

### 3.2. Estrés genotóxico por la presencia de MMS.

Con el fin de investigar si la presencia de alguna de las tres eIF2alfa quinasas es necesaria para la supervivencia de las células sometidas a estrés genotóxico producido por MMS en medio mínimo, estudiamos el crecimiento celular en placa de distintas cantidades de células de diferentes cepas de *S. pombe* en dichas condiciones de estrés (Figura 40).

Todas las cepas vieron disminuida su capacidad de crecimiento de un modo muy similar cuando fueron cultivadas en presencia de MMS. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen indicar que ninguna de las tres eIF2alfa quinasas es necesaria para el crecimiento de las células en presencia de MMS, ya que las células crecieron de un modo similar independientemente de la eIF2alfa quinasa que estuviera presente o ausente en las mismas. El crecimiento de las células tampoco se modificó significativamente por la ausencia de Sty1 en esta situación de estrés.

## Resultados



**Figura 40. Efecto del estrés genotóxico del MMS sobre la viabilidad celular en *S. pombe*.** Diluciones seriadas de cultivos de *S. pombe* de distintas cepas, según se indica en la figura, se sembraron por goteo sobre placas de medio EMM-Agar y se incubaron a 32°C durante 72 horas en presencia o ausencia de MMS a una concentración del 0.02%. En la zona izquierda de la figura aparecen los nombres de las cepas empleadas en el ensayo y en la zona superior el número de células sembrado.

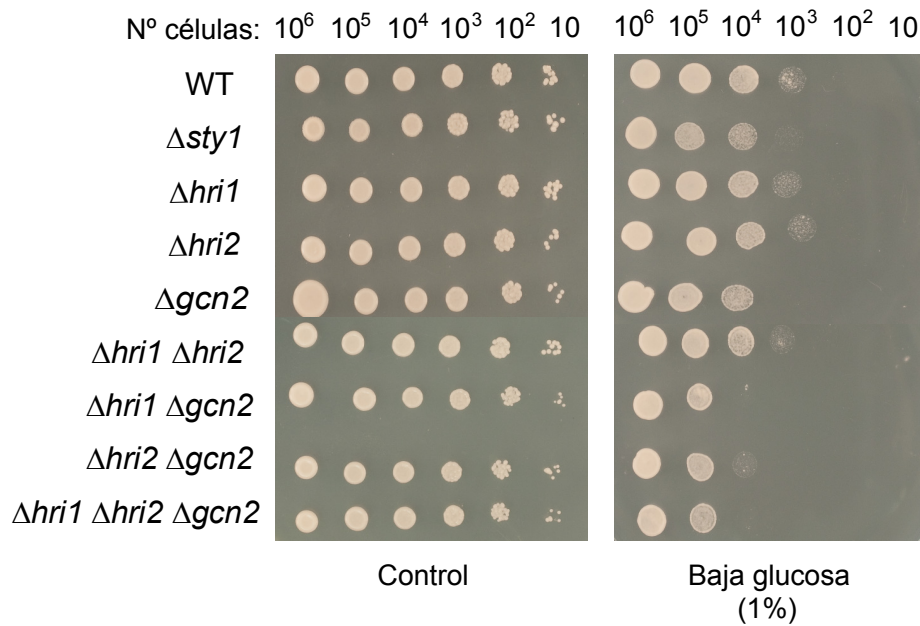
### 3.3. Estrés por deficiencia de glucosa en el medio de cultivo.

En este caso ensayamos la supervivencia de células de cepas mutantes que expresan dos, una o ninguna de las tres eIF2alfa quinasas en condiciones de baja glucosa (1%) en placas de medio mínimo (Figura 41).

Como ya sucedía en los dos tipos de estrés ensayados anteriormente, estrés oxidativo y estrés genotóxico, en condiciones de baja glucosa en el medio, se produjo una disminución en la supervivencia de todas las cepas ensayadas. Al igual que ocurría en estrés oxidativo, la cepa que carece de Sty1 mostró deficiencia en la supervivencia con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, en este caso, fueron las cepas que no expresan Gcn2 las que mostraron más dificultades para sobrevivir en esta situación de estrés. Por el contrario, la ausencia de Hri1, de Hri2 o de ambas, no modificó la capacidad de supervivencia de las células en condiciones de baja glucosa en el medio con respecto a la cepa silvestre.



## Resultados



**Figura 41. Efecto del estrés por baja disponibilidad de glucosa sobre la viabilidad celular en *S. pombe*.** Diluciones seriadas de cultivos de *S. pombe* de distintas cepas, según se indica en la figura, se sembraron por goteo sobre placas de medio EMM-Agar (Control) y de EMM-G Agar (Baja disponibilidad de glucosa) y se permitió el crecimiento a 32°C durante 72 horas. En la zona izquierda de la figura aparecen los nombres de las cepas empleadas en el ensayo y en la zona superior el número de células sembradas.

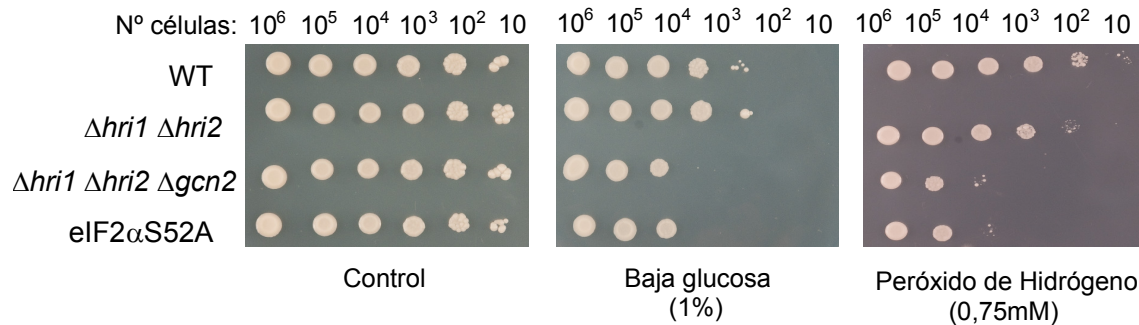
### 3.4. Implicación de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular en situaciones de estrés oxidativo y de baja glucosa.

Puesto que las células que carecen de Gcn2 son sensibles a estas dos situaciones de estrés y sobreviven peor que la cepa silvestre, decidimos estudiar si este hecho podría deberse a que Gcn2 fosforila al factor eIF2 y esta fosforilación mejora la supervivencia de las células o si Gcn2 estaría promoviendo otros procesos necesarios para dicha supervivencia. Para ello utilizamos la cepa que presenta la serina 52 del factor eIF2alfa sustituida por una alanina y que, por lo tanto, no puede fosforilarse (eIF2αS52A). Realizamos ensayos de estrés, por baja glucosa en el medio y por peróxido de hidrógeno, en placa utilizando diferentes cepas de *S. pombe* (Figura 42).

Los resultados muestran que la capacidad de supervivencia de las células de la cepa eIF2αS52A fue muy similar a la de aquellas células que no expresan ninguna de las tres eIF2alfa quinasas, que, a su vez, habían mostrado una capacidad de supervivencia igual a la de células que carecen de Gcn2. Ambas cepas son sensibles tanto en condiciones de baja glucosa en el medio como en presencia de peróxido de hidrógeno y tienen menor capacidad de supervivencia que las células de la cepa salvaje o de la cepa que sólo expresa Gcn2. Estos resultados sugieren que la fosforilación del

## Resultados

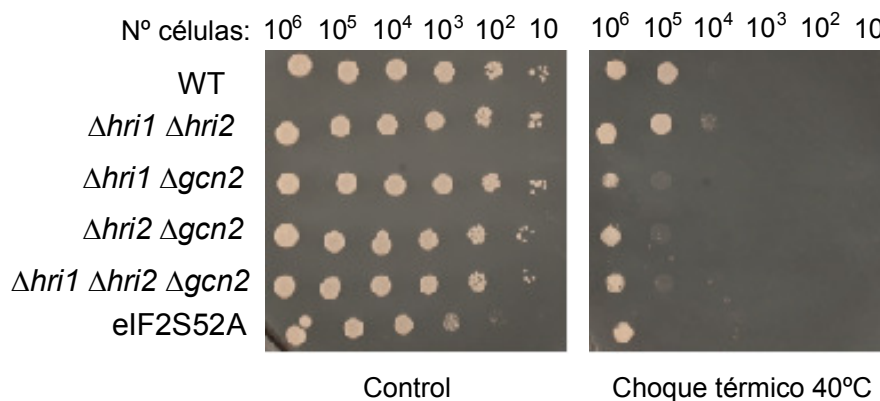
factor eIF2 por Gcn2 favorecería la supervivencia de las células en diferentes condiciones de estrés.



**Figura 42. Efecto de la fosforilación del factor eIF2 sobre la viabilidad celular en *S. pombe* en diferentes situaciones de estrés.** Diluciones seriadas de cultivos de *S. pombe* de distintas cepas, según se indica en la figura, se sembraron por goteo sobre placas de medio EMM, EMM-G y EMM suplementado con peróxido de hidrógeno 0.75 mM y se incubaron a 32°C durante 72 horas. En la zona izquierda de la figura aparecen los nombres de las cepas empleadas en el ensayo y en la zona superior el número de células sembrado.

### 3.5. Papel de las eIF2alfa quinasas y de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular de *S. pombe* en condiciones de estrés térmico a 40°C.

Con el fin de estudiar si la presencia de alguna de las tres eIF2alfa quinasas es necesaria para la supervivencia de las células al estrés térmico a 40°C en medio mínimo, estudiamos el crecimiento celular en placa de diferentes cepas de *S. pombe* tras mantenerlas durante 24 horas a 40°C (Figura 43).



**Figura 43. Efecto del estrés térmico sobre la viabilidad celular en *S. pombe*.** Diluciones seriadas de cultivo de *S. pombe* de distintas cepas, según se indica en la figura, se sembraron por goteo sobre placas de medio EMM-Agar y se incubaron a 40°C (choque térmico) o a 32°C (control) durante 24 horas. Posteriormente, se incubaron durante 48 horas a 32°C. En la zona izquierda de la figura aparecen los nombres de las cepas empleadas en el ensayo y en la zona superior el número de células sembradas.

## *Resultados*

---

En la figura se puede observar que las células que carecen de Gcn2 y las que presentan un eIF2alfa no fosforilable mostraron una reducida capacidad de supervivencia tras el choque térmico a 40°C respecto a las células de la cepa silvestre o a las que sólo expresan Gcn2.

Podemos concluir que la actividad de Gcn2 y la fosforilación de eIF2alfa son eventos que mejorarían la supervivencia de las células tras el choque térmico a 40°C.





## **Discusión**

***“El objetivo de la ciencia es buscar explicaciones sencillas para hechos complejos”.***

***Alfred North Whitehead.***



Las células eucariotas modulan y coordinan distintas respuestas para lograr una adaptación que permita la supervivencia ante los distintos cambios ambientales. Así, la exposición a luz ultravioleta, a estrés oxidativo, a cambios en la osmolaridad o en el pH o la exposición a altas o bajas temperaturas van a desencadenar cambios intracelulares encaminados a lograr la supervivencia.

En *S. pombe*, la ruta de señalización de la MAPK Sty1 induce la respuesta ante diferentes situaciones de estrés (Wang *et al*, 2005). Esta ruta de señalización responde a un amplio rango de estímulos y, mediante distintos mecanismos, modula la respuesta transmitiendo múltiples señales, a veces incluso, aparentemente opuestas entre sí, que permiten a la célula coordinar la duración e intensidad de la respuesta con el objetivo de permitir la supervivencia.

Ante diversas situaciones de estrés, se produce la activación de las eIF2alfa quinasas que fosforilan al factor eIF2 y promueven una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas, que va acompañada de la inducción de la expresión de genes de respuesta a estrés. En la levadura *S. pombe*, se han identificado tres eIF2alfa quinasas responsables de la fosforilación del factor eIF2 que se activan en diferentes situaciones de estrés: Gcn2, Hri1 y Hri2 (Zhan *et al*, 2002). La presencia de tres eIF2alfa quinasas en esta levadura y el hecho de que dos de ellas, Hri1 y Hri2, presenten una gran homología entre sí y pertenezcan a la misma familia, nos condujo a analizar la posible activación diferencial de dichas quinasas en función del tipo de estrés al que se someten las células. Además, puesto que la principal ruta implicada en la respuesta al estrés ambiental en *S. pombe* es la de la MAPK Sty1, investigamos la posible coordinación entre esta ruta de respuesta a estrés y la ruta de las eIF2alfa quinasas. Puesto que la activación de la ruta de Sty1 se produce por diferentes mecanismos, en función de la situación de estrés a la que se encuentre sometida la célula, estudiamos la actividad de Sty1 y de las eIF2alfa quinasas y la posible relación entre ambas rutas de señalización en diversas situaciones de estrés como: estrés oxidativo, daño genotóxico, choque térmico o privación de nutrientes.

La eIF2alfa quinasa Gcn2 es una proteína conservada desde levaduras hasta mamíferos que, además de responder al estrés fosforilando al factor eIF2, se ha relacionado con la modulación del ciclo celular en *S. pombe* (Petersen y Nurse, 2007; Tvegard *et al*, 2007). Por ello, nos propusimos estudiar la implicación de las eIF2alfa quinasas y de la fosforilación del factor eIF2 en la regulación del ciclo celular en situaciones de estrés.

## 1. Caracterización funcional de las eIF2alfa quinasas de *S. pombe* y su relación con la ruta de señalización de la MAPK Sty1.

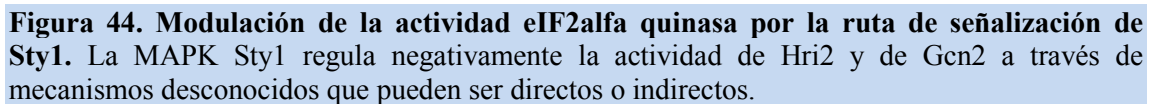
### 1.1. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se debe a la presencia de especies reactivas de oxígeno tales como radicales hidroxilo, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. En la célula, en situaciones de estrés oxidativo, se produce la activación de diferentes rutas de señalización que conducen a una respuesta coordinada que permita la supervivencia de las células. Así, se activan rutas de señalización que conducen a un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes, como catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa, que permiten reducir la concentración de especies reactivas de oxígeno en el interior de la célula.

En situaciones de estrés oxidativo se produce un rápido incremento en la cantidad de eIF2alfa fosforilado que promueve la inhibición de la síntesis de proteínas en la célula (Mark y Jones, 2004). Previamente, se había propuesto que Hri2 y Gcn2 se activaban en respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio durante una hora (Zhan *et al*, 2004; Dunand-Sauthier *et al*, 2005). Nuestros estudios han demostrado que, efectivamente, los niveles de fosforilación de eIF2alfa se elevan en respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio en células que sólo expresan Hri2 o Gcn2 a tiempos largos de exposición. Sin embargo, nosotros encontramos diferencias, por primera vez, en la activación de Gcn2 y de Hri2 en respuesta a estrés oxidativo a tiempos cortos. Así, observamos que Gcn2 es la primera eIF2alfa quinasa en responder y que Hri2 se activa de forma más tardía, cuando las células carecen de Gcn2. No podemos determinar si la activación de Hri2 se produce únicamente de manera compensatoria para poder responder a este tipo de estrés por la ausencia de Gcn2 o si se produce de forma complementaria a la activación de Gcn2. Hri1 no se activa en respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno.

La ruta de señalización de Sty1 se activa en respuesta a estrés oxidativo para promover la transcripción de genes involucrados en la respuesta a dicho estrés. En respuesta a estrés oxidativo, las proteínas histidil quinasa actúan como sensores del estímulo; estas proteínas, mediante un mecanismo de fosforrelevo, promueven la activación de Wis1, que, a su vez, fosforila a Sty1 (Shiozaki *et al*, 1997; Nguyen *et al*, 2000). En respuesta a estrés oxidativo se produce una rápida activación de Sty1, observándose un incremento en su fosforilación ya a los 5 minutos de tratamiento. Estudios previos (Dunand-Sauthier *et al*, 2005) sugerían la existencia de una posible relación entre la ruta de señalización de Sty1 y la ruta de las eIF2alfa quinasas.

Además, esta conclusión fue corroborada en cepas que sobre-expresan Sty1, donde dicha sobre-expresión produjo un efecto negativo sobre la activación de las eIF2alfa quinasas en respuesta a estrés oxidativo.



75

modulando la transcripción de los genes que las codifican. En respuesta al estrés oxidativo Sty1 se transloca al núcleo donde regula la expresión de genes de respuesta a estrés a través del factor de transcripción Atf1. Dunand-Sauthier y colaboradores propusieron en 2005 que Atf1 puede estar mediando la regulación de la actividad de las eIF2alfa quinasas en respuesta a este estrés.

### 1.2. Estrés genotóxico.

El metil metano sulfonato es un agente alquilante con capacidad genotóxica. Krohn y colaboradores describieron en 2008 que en la levadura *S. pombe* se produce un incremento en los niveles de fosforilación del factor eIF2 tras la exposición al agente genotóxico MMS (Krohn *et al*, 2008). Nuestros resultados prueban que tanto Gcn2 como Hri2 se activan tras 15 minutos de exposición a este agente. Gcn2, al igual que sucedía en la respuesta a estrés oxidativo, es la primera eIF2alfa quinasa en activarse, mientras que Hri2 se activa, al menos en ausencia de Gcn2, a tiempos más tardíos.

Cuando investigamos la posible regulación de las eIF2alfa quinasas por Sty1 en respuesta a la presencia de MMS, comprobamos que Sty1 no se activa significativamente en esta situación de estrés. La exposición a MMS conlleva la activación de Gcn2, pero no promueve ningún cambio en la fosforilación de Sty1. Tampoco se producen cambios en la respuesta de las eIF2alfa quinasas en función de la presencia o ausencia de Sty1, como, por otro lado, cabía esperar puesto que Sty1 no se activa en respuesta a la presencia de MMS en nuestras condiciones de ensayo.

Estos resultados nos harían inclinarnos por la hipótesis de la regulación inmediata de la actividad de las eIF2alfa quinasas por Sty1 en situaciones de estrés oxidativo, ya que si la mayor respuesta al estrés de Gcn2 y Hri2 en ausencia de Sty1 se debiera a un aumento en su cantidad en las células, deberíamos observar este efecto en todos los tipos de estrés o, incluso, en ausencia de estrés. La activación simultánea de ambas rutas serviría a las células para detener la síntesis de las proteínas necesarias en condiciones normales de crecimiento para posteriormente responder al estrés sintetizando las proteínas codificadas por genes cuya transcripción es estimulada por la actividad de Sty1. Por ello, sería lógico pensar que la activación de Sty1 promueva la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la actividad de las eIF2alfa quinasas.

### 1.3. Estrés térmico.

Cuando los organismos se someten a temperaturas de al menos 5°C por encima de su temperatura fisiológica decimos que se encuentran en choque térmico. En situaciones de choque térmico, los niveles de eIF2alfa fosforilado se incrementan

rápidamente para inhibir la síntesis de proteínas y propiciar la expresión de proteínas que participan en la respuesta para paliar los efectos negativos del estrés térmico.

En 2004, Zhan y colaboradores describieron que tanto Hri2 como Gcn2 se activan en respuesta al choque térmico (Zhan *et al*, 2004). Nuestros resultados indican que la activación de las eIF2alfa quinasas sucede de modo casi inmediato. Los datos expuestos en este trabajo certifican que Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa que participa en la fosforilación del factor eIF2 cuando las células se someten a choque térmico a diferentes temperaturas: 40°C y 48°C. Al menos en ausencia de esta proteína quinasa, Gcn2 se activa a tiempos más largos de tratamiento. Gcn2 se puede estar activando para ayudar a Hri2 a responder a choque térmico cuando las células permanecen durante períodos prolongados de tiempo a temperaturas superiores a la fisiológica. En ausencia de Hri2, se produce la activación de Gcn2 para poder proporcionar una respuesta a choque térmico adecuada que promueva la inhibición de la síntesis de proteínas.

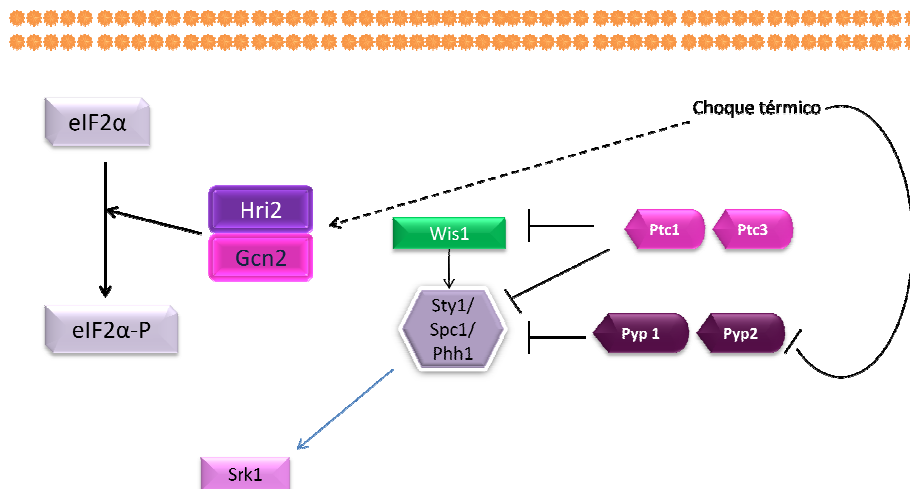
A tiempos cortos de estrés térmico a 48°C, observamos una reducción en los niveles de fosforilación de eIF2alfa en aquellas cepas que carecen de Hri2, llegando a estar los niveles de fosforilación de eIF2 por debajo de los observados en células no tratadas. Este hecho sugiere que se está activando una eIF2alfa fosfatasa de forma muy temprana como consecuencia de las altas temperaturas a las que se exponen las células. Esta actividad eIF2alfa fosfatasa, que en las células de la cepa salvaje pasa desapercibida, podría estar activándose para contrarrestar una parada prolongada de la síntesis de proteínas a consecuencia de una alta tasa de fosforilación de eIF2alfa, permitiendo a las células traducir los ARN mensajeros que codifican por proteínas necesarias para la respuesta de supervivencia celular en estas condiciones.

El choque térmico promueve la inhibición de Pyp1 y Pyp2, favoreciendo que la mera actividad basal de Wis1 sobre Sty1 provoque una fuerte activación de Sty1 (Shiozaki *et al*, 1998), que, sin embargo, se atenúa rápidamente (Figura 45). El choque térmico está provocando la inhibición de Pyp1 y de Pyp2, pero no de las PP2C fosfatasas que defosforilan la treonina 171 de Sty1 rápidamente (Nguyen y Shiozaki, 1999).

De acuerdo con resultados previos (Nguyen y Shiozaki, 1999), nuestros datos reflejan una activación transitoria de Sty1 en respuesta a choque térmico a 48°C, ya que a los 5 minutos de tratamiento observamos un pico de fosforilación de Sty1 que rápidamente disminuye, y a los 10 minutos es ya prácticamente indetectable. Sin embargo, no hemos detectado ningún cambio en la actividad de Hri2 en función de la presencia o ausencia de Sty1 o de la fosfatasa Pyp1, lo que indica que la regulación de ambas rutas tiene lugar de modo independiente (Figura 45). Estos resultados parecen sugerir que cuando la activación de Sty1 tiene lugar por la inhibición de las fosfatasas



Pyp1 y Pyp2, la ruta de señalización de Sty1 no modula la respuesta de esta eIF2alfa quinasa.



**Figura 45. Respuesta a estrés por choque térmico en *S. pombe*.** La MAPK Sty1 se activa por la inhibición por choque térmico de las fosfatasa Pyp1 y Pyp2. Las eIF2alfa quinasa Hri2 y, en menor grado, Gcn2 se activan por choque térmico y su actividad no está modulada por la activación de Sty1.

### 1.4. Entrada en la fase estacionaria.

Las células necesitan tener disponibilidad de diversos nutrientes para poder crecer, dividirse y sobrevivir. Cuando un cultivo alcanza una densidad celular muy alta la disponibilidad de nutrientes en el medio es baja y las células han de activar diversas rutas de respuesta a estrés que les permitan sobrevivir. Cuando las células en cultivo entran en la fase estacionaria de crecimiento se produce la activación de las SAPKs, se fosforila Sty1, se acumula en el núcleo y promueve la transcripción de genes implicados en la respuesta al estrés (Zuin *et al*, 2005).

En nuestros experimentos comprobamos que a medida que un cultivo de *S. pombe* entra en fase estacionaria se produce un incremento en la fosforilación del factor eIF2; esta fosforilación promovería la inhibición de la síntesis de proteínas que permitirá a las células reducir el gasto de nutrientes. En este caso, Hri1 parece ser la eIF2alfa quinasa que más se activa y fosforila al factor eIF2 cuando el cultivo entra en la fase estacionaria de crecimiento. Este aumento en su actividad podría estar motivado en gran medida por un notable incremento en la cantidad de proteína Hri1, que también se da, aunque en menor medida en el caso de Hri2. Estos resultados sugieren que la expresión de estas proteínas debe estar regulada por alguna ruta de respuesta a estrés que se active como consecuencia de la ausencia de nutrientes en el medio para promover la inhibición de la síntesis de proteínas.

Consideramos de gran importancia el hecho de que la respuesta esté promovida a través de la activación de Hri1, puesto que hasta el momento no se había descrito ningún tipo de estrés capaz de activar esta eIF2alfa quinasa. Cuando las células alcanzan la fase estacionaria en el medio de cultivo se promueve la fosforilación del factor eIF2 principalmente a través de la actividad de Hri1.

### 1.5. Ausencia de nutrientes.

#### 1.5.1. Ausencia de glucosa.

La glucosa, además de una fuente de energía fundamental, es una importante molécula implicada en señalización, capaz de promover cambios metabólicos en las células (Bilsland-Marchensan *et al*, 2000). La activación de cascadas de señalización por glucosa promueve el envejecimiento celular debido a la acumulación de ROS (Roux *et al*, 2009). Cuando las células de *S. pombe* se mantienen en un medio con bajas concentraciones de glucosa y suplementado con glicerol como fuente de carbono, se aumenta la respiración mitocondrial y el consumo de oxígeno permitiendo que las células alcancen una mayor longevidad (Zuin *et al*, 2008; Zuin *et al*, 2010). La ausencia de glucosa desencadena la activación de rutas de señalización que activan factores de transcripción y la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés (Brewster *et al*, 1993).

Nuestros datos evidencian que la privación de glucosa promueve un incremento en la fosforilación del factor eIF2. Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa responsable de la fosforilación del factor en ausencia de glucosa en el medio. Cuando las células se someten a privación de glucosa en medio rico (YE) observamos una activación de Gcn2 y de Hri1 en aquellas cepas que carecen de Hri2; sin embargo, cuando estas células se mantienen en ausencia de glucosa en medio mínimo sólo observamos activación de Hri1, pero no de Gcn2, en ausencia de Hri2. Puesto que en medio mínimo se ha descrito una activación de Sty1 cuando las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (Zuin *et al*, 2010), pensamos que Sty1, en ausencia de glucosa en medio mínimo, se podría estar activando y regulando negativamente a Gcn2. En medio YE con bajas concentraciones de glucosa también se produce la activación de Sty1, pero a tiempos más largos (Zuin *et al*, 2010), lo que permitiría detectar una activación de Gcn2 a los tiempos a los que realizamos el tratamiento.

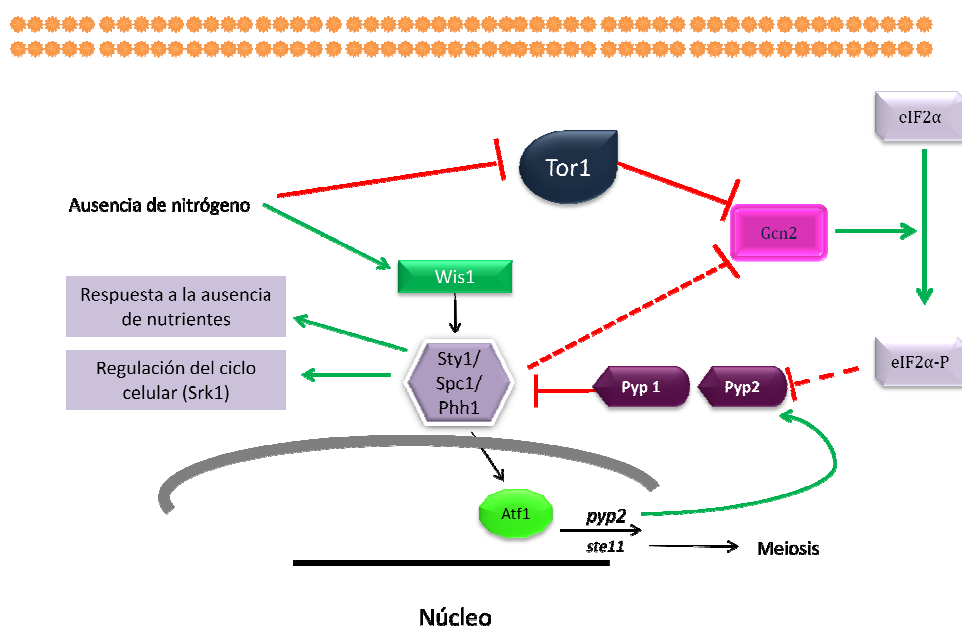
#### 1.5.2. Ausencia de nitrógeno.

El amonio es una de las principales fuentes de nitrógeno inorgánico que permite un crecimiento óptimo de las levaduras (Grundmann *et al*, 2001). El ayuno de nutrientes

promueve la activación de Sty1, que, a su vez, promueve la activación del factor de transcripción Atf1, activando la expresión de Ste11 (Takeda *et al*, 1995).

Nuestros resultados muestran que la ausencia de nitrógeno induce la fosforilación del factor eIF2. Los datos obtenidos indican que Hri1 es la eIF2alfa quinasa que produce una respuesta más intensa y duradera (más de 2 horas), mientras que Gcn2, que también se activa, lo hace con menor intensidad y de forma limitada en el tiempo (hasta 1 hora). Hri2, sin embargo, no responde a esta situación de estrés.

Los resultados de los experimentos con los mutantes de delección de Sty1 y de Pyp1 sugieren que Sty1 modula negativamente la actividad eIF2alfa quinasa cuando las células se encuentran en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, puesto que la falta de Sty1 en las células potencia la fosforilación de eIF2alfa, incluso en el caso de Hri2, que no respondía a este tipo de estrés.



**Figura 46. Respuesta a estrés por ausencia de nitrógeno en *S. pombe*.** Gcn2 se activa como consecuencia de la inhibición de Tor1 y regula negativamente los niveles de Pyp2. Esta regulación promueve la activación de Sty1 que interviene regulando el ciclo celular e inhibiendo a Gcn2.

Petersen y Nurse en 2007 propusieron que la activación de Gcn2, consecuencia de la inhibición de la señal de TOR por la ausencia de nitrógeno en el medio, reduciría los niveles de la fosfatasa Pyp2, promoviendo así un aumento en la fosforilación de Sty1 y, por tanto, en su grado de activación (Figura 46). Nuestros datos indican que, efectivamente, la presencia de Gcn2 promueve la activación de Sty1 en ausencia de

nitrógeno en el medio de cultivo. Es decir, se requiere la presencia de Gcn2 en las células para que se produzca un notable incremento en la fosforilación de Sty1, que coincide con la caída en los niveles de eIF2alfa fosforilado tras una hora de tratamiento. Curiosamente, cuando no hay Gcn2 en las células, se produce la activación de Hri1 y la consecuente fosforilación de eIF2alfa, que se prolonga más allá de las dos horas de tratamiento, pero esta respuesta no promueve la fosforilación de Sty1. Este hecho subraya la importancia de Gcn2 en este proceso, tal vez, porque se requiera tan solo una fosforilación transitoria del factor eIF2 para el correcto desarrollo del proceso.

### **1.6. Regulación de la expresión de las eIF2alfa quinasas durante el estrés oxidativo y el choque térmico.**

En situaciones de estrés celular se produce la inhibición de la síntesis generalizada de proteínas, pero también un aumento en la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés. La fosforilación del factor eIF2 puede promover cambios en la expresión génica que favorezcan la expresión de genes que faciliten la supervivencia en condiciones estresantes para la célula. Así, en *S. cerevisiae*, en situaciones de privación de glucosa o de aminoácidos la fosforilación del factor eIF2 estimula la expresión de Gcn4, un activador transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1997; Hinnebusch, 2000). Sin embargo, en *S. pombe* no se ha podido encontrar ningún ortólogo de Gcn4 hasta el momento.

En situaciones de estrés, la activación de Sty1 desemboca en un cambio en la expresión génica, el conjunto de genes CESR (“core environmental stress response”) se induce o se reprime en función de las condiciones ambientales.

Teniendo en cuenta que las eIF2alfa quinasas son proteínas involucradas en la respuesta al estrés, estudiamos si en situaciones de estrés que promovían su activación, se producían cambios de su expresión en las células. Así, comprobamos que en situaciones de estrés oxidativo aumenta significativamente la cantidad de ARNm de Hri2 y de Gcn2, sucediendo lo mismo en cuanto a la cantidad de proteína. En el caso de Hri1 observamos una ligera disminución en la cantidad de ARNm y de proteína cuando las células se sometían a estrés oxidativo a tiempos cortos. Puesto que Gcn2 y Hri2 son las eIF2alfa quinasas encargadas de la respuesta a estrés oxidativo, resulta lógico pensar que la célula esté incrementando la expresión de ambas para favorecer una respuesta a esta situación de estrés.

El choque térmico a 40°C induce la expresión de las tres eIF2alfa quinasas, aumentando la cantidad tanto de mensajero como de proteína. Hri2 y Gcn2 responden a este tipo de estrés por lo que podríamos pensar que la célula está incrementando la expresión de las mismas para favorecer la respuesta a la situación de choque térmico.

El incremento en los niveles de expresión de Hri1, a pesar de que esta proteína no está fosforilando al factor eIF2 en condiciones de choque térmico a 40°C, podría indicar que Hri1 tiene otra función en respuesta a choque térmico. En nuestros experimentos hemos observado que aquellas cepas que únicamente expresan Hri1, cuando son sometidas a choque térmico en placa en medio rico, sobrevivían peor que otras cepas mutantes en las otras eIF2alfa quinasas, incluso peor que el triple mutante que no expresa ninguna de las tres eIF2alfa quinasas (datos no mostrados). Estos resultados podrían estar sugiriendo un nuevo papel de Hri1, desconocido hasta este momento, que implicase una inhibición del crecimiento tras el choque térmico a 40°C; efecto que, curiosamente, fue revertido por la ausencia de Pyp1 en esas células.

El choque térmico a 48°C produce una disminución significativa de las cantidades de ARNm y de proteína de las tres eIF2alfa quinasas. Es muy probable que a esta temperatura se esté produciendo una desnaturalización generalizada de las proteínas celulares y una inhibición generalizada de la síntesis de mensajeros que permita únicamente la expresión de ARNm esenciales para la supervivencia celular.

## **2. Implicación de la actividad eIF2alfa quinasa en la modulación del ciclo celular de *S. pombe* en situaciones de privación de nitrógeno.**

La mayoría de las células de *S. pombe* en cultivo en medio rico se encuentran en la fase G2 del ciclo celular, ya que ésta es la fase más larga del ciclo celular de *S. pombe*. Cuando la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo disminuye, las células detienen su ciclo celular en la fase G1 (Kawai *et al*, 2001). En el caso de que estén presentes los dos tipos sexuales en el cultivo se iniciaría el desarrollo sexual, en caso contrario, las células entran en un estado quiescente que les confiere mayor resistencia al estrés.

### **2.1. Papel modulador de las eIF2alfa quinasas y de la fosforilación del factor eIF2 en la parada en G1 originada por la ausencia de nitrógeno.**

La actividad de Gcn2 es necesaria para que las células, tras la exposición a determinados agentes genotóxicos, retarden el paso de la fase G1 a la fase S (Tvegard *et al*, 2007; Krohn *et al*, 2008). Este retardo es equivalente al tiempo en que el factor eIF2 permanece fosforilado.

Cuando disminuyen las concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo las células detienen su ciclo celular en la fase G1. Esta respuesta es dependiente de la

proteína Tor1. La inactivación de Tor1 por la ausencia de nitrógeno promueve la activación de la MAPK Sty1 a través de la activación de la eIF2alfa quinasa Gcn2 (Petersen y Nurse, 2007). La activación de Sty1 induce la activación de Cdc2 y acelera la entrada en mitosis (Figura 47).

Nuestros resultados muestran una activación, aparentemente transitoria, de Gcn2 en condiciones de ausencia de nitrógeno y cómo en aquellas células que expresan Gcn2 se produce la fosforilación de Sty1, coincidiendo con la disminución de la cantidad de eIF2alfa fosforilado, mientras que en aquellas células que no expresan Gcn2 no observamos un incremento en la fosforilación de Sty1, a pesar de la significativa activación de Hri1.

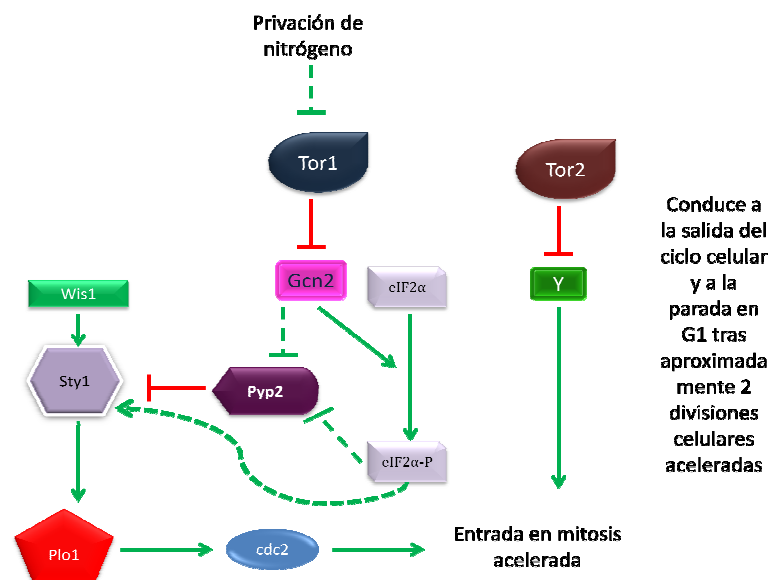
Los datos de citometría de flujo nos indican que aquellas células que carecen de Gcn2 presentan un significativo retraso en la parada del ciclo celular en G1 en condiciones de ausencia de nitrógeno. En las curvas de crecimiento pudimos certificar que aquellas células que no expresan Gcn2 tardan más en dividirse en ausencia de nitrógeno. Todos estos datos parecen confirmar el modelo propuesto por Petersen y Nurse en 2007 según el cual Gcn2 promueve la activación de Sty1 en ausencia de nitrógeno, acelerando la entrada en mitosis para que las células entren en G1 y detengan su ciclo celular (Figura 47). Además, hemos podido comprobar que para que la detención del ciclo celular se produzca a tiempo es necesaria la fosforilación del factor eIF2. Dicha fosforilación podría ser necesaria para que las células sean capaces de acelerar su entrada en mitosis dividiéndose a un menor tamaño.

Cuando las células se encuentran en un medio sin nitrógeno detienen su ciclo celular en G1 y se vuelven más cortas y redondeadas. Tras 12 horas sin nitrógeno, en ausencia de células de tipo sexual opuesto, las células entran en fase G0. Se denomina fase G0 a un estado de quiescencia, en el que las células engrosan su pared celular, adquieren una forma redondeada, abundan las vacuolas y presentan elevadas cantidades de la proteína Rum1. Nuestros resultados muestran que las células que expresan un factor eIF2 no fosforilable, tras 24 horas en ausencia de nitrógeno, apenas ven modificada su morfología, lo que nos indica que dichas células no están entrando en mitosis ni tampoco en ese estado de quiescencia que permite una mejor supervivencia de las células ante una situación adversa. Puesto que la inhibición de la ruta de señalización de TOR promueve la entrada en este estado de quiescencia (Yanagida, 2009), todos los datos analizados nos indican que la fosforilación del factor eIF2 está implicada en la ruta de señalización de Tor1 en respuesta a la ausencia de amonio en el medio de cultivo.

La escasez de fuentes de nitrógeno induce una degradación de las proteínas celulares que permite a las células sintetizar nuevas proteínas involucradas en la diferenciación sexual o necesarias para la entrada en un estado quiescente. Nuestros

resultados demuestran cómo en las células que carecen de Gcn2 o que presentan un factor eIF2alfa no fosforilable, el proceso de degradación de proteínas también sucede con un evidente retraso. Estos datos parecen evidenciar que tanto la activación de Gcn2 como la fosforilación del factor eIF2 son eventos necesarios para que tengan lugar distintos procesos que permitan a las células acelerar la entrada en mitosis y detener su ciclo celular en G1 de una forma eficiente, promoviendo la diferenciación sexual o la entrada en un estado quiescente que favorezca la supervivencia en situaciones de ausencia de nitrógeno.

Se ha descrito que en situaciones de escasez de nitrógeno, las células de *S. pombe* salen del ciclo celular vegetativo e inician su diferenciación sexual con el fin de producir esporas. La respuesta producida por la ausencia de nitrógeno en el medio se transmite por la ruta de señalización de TOR (Otsubo y Yamamoto, 2008; Weisman *et al*, 2005). Sabemos que la ausencia de nitrógeno en el medio conduce a una degradación de las proteínas celulares (Nakashima *et al*, 2006) y que la mayor parte del nitrógeno utilizado para la síntesis *de novo*, de proteínas implicadas en la diferenciación sexual y necesarias para la esporulación, derivan de un proceso de autofagia (Mukaiyama *et al*, 2010). Estos datos nos llevan a pensar en la posibilidad de que la actividad de Gcn2 y la fosforilación del factor eIF2 estén implicadas, de algún modo, en la activación de procesos de autofagia necesarios para la degradación de proteínas encaminada a la obtención de nitrógeno que permita a las células sintetizar proteínas necesarias para la esporulación.



**Figura 47. Regulación de la parada del ciclo celular en G1 por ausencia de nitrógeno en *S. pombe*.** Gcn2 se activa como consecuencia de la inhibición de Tor1 y regula negativamente los niveles de Pyp2. Esta regulación promueve la activación de Sty1 que interviene regulando el ciclo celular e inhibiendo a Gcn2. Nosotros proponemos que es la fosforilación del factor eIF2 por Gcn2 el evento implicado en la activación de Sty1 y en la regulación del ciclo celular. Las conexiones en verde indican aceleración del ciclo celular, las rojas inhibición.



Probablemente, la activación de Gcn2 esté involucrada en la ruta de respuesta de TOR, más concretamente de Tor1, como ya sugerían los resultados de Petersen y Nurse publicados en 2007. Pero, nuestros resultados sugieren que la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  por Gcn2 es un evento necesario para promover la activación de Sty1 y de Cdc2 a través de la ruta de respuesta de Tor1. Nuestros datos indican que la fosforilación del factor eIF2 es necesaria para que la parada del ciclo celular en G1 se produzca a tiempo, rebatiendo la hipótesis de Petersen y Nurse en 2007 que afirmaban que la activación de Gcn2 desencadenaría la aceleración de la entrada en mitosis para detener el ciclo celular en G1 de una forma directa o, al menos, independiente de la fosforilación de eIF2.

### 2.2. Papel de la fosforilación del factor eIF2 en la diferenciación sexual.

Durante el ciclo celular Cdc2 inhibe a Ste11 por fosforilación. En la fase G1 el complejo Cdc2-Cdc13 se degrada y Ste11 permanece no fosforilado, permitiéndose, si existe una situación favorable para el comienzo de la diferenciación sexual, la transcripción de genes necesarios para dicha diferenciación (Kjaerulff *et al*, 2007).

Para que el ciclo celular se detenga en G1 es necesario el factor de transcripción Atf1. La ruta Wis1/Sty1/Atf1 es importante para la transcripción de Ste11 (Shiozaki y Russell, 1996). Ste11 es una proteína perteneciente al grupo de alta movilidad (HMG: high mobility group) y es el principal factor de transcripción de los genes que codifican proteínas involucradas en la conjugación y en la meiosis (Takeda *et al*, 1995). La expresión de Ste11 es dependiente de los niveles de AMPc, de la ruta de señalización de las MAPKs de respuesta a feromona y de la ruta de las MAPKs de respuesta a estrés. Las células que carecen de Atf1 o de Sty1 no pueden parar su ciclo celular en G1 en ausencia de nitrógeno en el medio y presentan tasas de formación de esporas muy bajas, por lo que son prácticamente estériles (Shiozaki y Russell, 1996).

En *S. pombe*, Tor1 es necesaria para la parada del ciclo celular en G1 y para el inicio del desarrollo sexual que permite la esporulación y el proceso de meiosis (Kawai *et al*, 2001). Las células que carecen de Tor1 no detienen el ciclo celular en G1 en situaciones de ausencia de nitrógeno, sin embargo, la expresión de Ste11 no se modifica. La ausencia de Tor1 deriva en una reducción en los niveles de apareamiento de las células de *S. pombe* (Weisman, 2004).

Puesto que las células que presentan un eIF2 no fosforilable presentan problemas a la hora de detener su ciclo celular en G1 y son incapaces de entrar en la fase G0 o de quiescencia, pensamos que podrían tener alguna dificultad en la transducción de la señal inhibitoria de la ruta de Tor1. En ese caso, las células que presentan el eIF2 mutado deberían de presentar deficiencias en la conjugación y en la meiosis. Estudiamos el



porcentaje de apareamiento y comprobamos que es tan bajo como el que presenta una cepa que no expresa Sty1. Estos datos nos indican que, efectivamente, las células que presentan el factor eIF2 no fosforilable tienen una grave deficiencia en el apareamiento que podría ser consecuencia de un problema en la inhibición de la ruta de señalización de Tor1 o bien en la ruta de activación de Sty1. Ambas rutas de señalización, la ruta de Tor1 y la de Sty1, como ya hemos indicado anteriormente, podrían estar relacionadas, según lo descrito por Petersen y Nurse en 2007, a través de Gcn2. Nuestros resultados podrían indicar que la fosforilación del factor eIF2 por Gcn2, y no otros eventos en los que esta proteína quinasa pueda estar participando, podría ser la responsable de una coordinación entre la ruta de Tor1 y la de la MAPK Sty1 en la parada del ciclo celular en G1 y en los procesos de diferenciación sexual en *S. pombe*.

### **3. Papel de Gcn2 y de la fosforilación del factor eIF2 en la supervivencia celular en diferentes situaciones de estrés.**

Nuestros resultados han demostrado que la activación de las eIF2alfa quinasas es dependiente del tipo de estrés y de la duración del mismo. Estos resultados indican que la respuesta al estrés va a seguir distintas vías que van a determinar la activación de una u otra eIF2alfa quinasa. Cuando la situación estresante se mantiene en el tiempo puede producirse la activación de otra eIF2alfa quinasa que colabore en la respuesta al estrés.

Los datos obtenidos en los experimentos de supervivencia celular nos han permitido conocer que Gcn2 es una proteína quinasa que juega un importante papel en las células, favoreciendo la supervivencia de las mismas en diferentes situaciones de estrés. Así, en condiciones de estrés oxidativo, baja glucosa en el medio o choque térmico las células que carecen de Gcn2 ven disminuida su capacidad de supervivencia. Además, nuestros resultados sugieren que es la fosforilación del factor eIF2 lo que favorece la supervivencia de las células durante la exposición a estrés oxidativo, cuando las células se encuentran en condiciones de baja glucosa o tras el choque térmico. Sin embargo, las células no exhiben ninguna diferencia en su capacidad de supervivencia, en función de la presencia o ausencia de las eIF2alfa quinasas, cuando se las somete a otros tipos de estrés como el estrés genotóxico causado por la presencia de MMS en el medio de cultivo.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de eIF2alfa por Gcn2 es un evento necesario para favorecer la supervivencia de las células en diferentes condiciones de estrés.

Cuando las células se crecieron en medio rico no pudimos encontrar diferencias significativas en su supervivencia frente al estrés en función de la presencia o ausencia

de las eIF2alfa quinasas, mientras que hemos encontrado diferencias muy evidentes en la supervivencia de las células al realizar los experimentos en medio mínimo. En condiciones en las que las células disponen de multitud de nutrientes, podrían estar activándose mecanismos compensatorios que faciliten la supervivencia en las diferentes situaciones de estrés de forma completamente independiente de la actividad de las eIF2alfa quinasas. Sin embargo, en medio mínimo, donde las células disponen únicamente de los nutrientes básicos para sobrevivir, parece adquirir una mayor relevancia la regulación de la expresión génica, a través de la síntesis de proteínas, para que las células dispongan de recursos energéticos y de un repertorio de proteínas que les permitan una adecuada respuesta al estrés y, por tanto, mayores posibilidades de supervivencia.

### Resumen general y perspectivas.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido conocer el importante papel que juegan las eIF2alfa quinasas en la respuesta celular al estrés. Hemos comprobado como en función del tipo de estrés que está afectando a las células de *S. pombe*, se produce la activación de una u otra eIF2alfa quinasa. Así, en respuesta a estrés oxidativo o genotóxico, Gcn2 juega un papel principal en la inhibición de la traducción. Hri2 es la principal eIF2alfa quinasa responsable de la respuesta a bajas concentraciones de glucosa en el medio y al choque térmico. Además, por primera vez, hemos observado que Hri1 se activa como consecuencia de la entrada de las células en la fase estacionaria de crecimiento o de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos han demostrado que la actividad eIF2alfa quinasa favorece la supervivencia celular en determinadas situaciones estresantes para las células, pero no bajo otras condiciones de estrés. Además hemos comprobado como la activación de rutas de respuesta a estrés desencadena cambios en la expresión de las eIF2alfa quinasas, afectando tanto a la cantidad de ARN mensajero como de proteína.

Este trabajo nos ha permitido estudiar la relación existente entre la ruta de activación de las eIF2alfa quinasas y otras rutas de respuesta, como la ruta de la MAPK Sty1 de respuesta a estrés, o la ruta de TOR implicada en la respuesta a la privación de nutrientes en el medio. Hemos comprobado cómo, en situaciones de estrés oxidativo o de ausencia de nitrógeno en el medio, la actividad eIF2alfa quinasa está regulada negativamente por la activación de la ruta de Sty1, hecho que no sucede en otras condiciones estresantes para la célula, indicándonos que en función del tipo de estrés la respuesta celular es diferente. Así mismo, en situaciones de ausencia de nitrógeno, hemos observado que la activación de Gcn2 favorece la fosforilación de Sty1, probablemente a través de la ruta de señalización de Tor1, tal y como hemos explicado.

Nuestros resultados también nos han mostrado la participación de Gcn2 y la fosforilación del factor eIF2 en el control del ciclo celular en situaciones de privación de nitrógeno. Gcn2, a través de la fosforilación del factor eIF2 interviene en la detención del ciclo celular en G1, probablemente, modulando la activación de Sty1 y permitiendo la entrada en mitosis de las células a un menor tamaño. Esta modulación del ciclo celular probablemente viene dada por la inhibición de Tor1, consecuencia de la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, que conduciría a la activación de Gcn2. Para comprobar esta relación entre la inhibición de Tor1 y la activación de Gcn2, actualmente estamos realizando ensayos con rapamicina utilizando mutantes de delección que sólo expresan una de las tres eIF2alfa quinasas. También estamos realizando ensayos de estrés por presencia de rapamicina con cepas de delección de Sty1 y de Pyp1 para estudiar si Sty1 está modulando la activación de Gcn2, como ya sucedía en situaciones de ausencia de nitrógeno. Además, estamos intentando estudiar si las eIF2alfa quinasas también juegan un papel modulador de la parada del ciclo celular en otras situaciones que conllevan la parada del mismo, como la exposición de las células a la presencia de hidroxiiurea. También estamos investigando si la presencia de alguna de las tres eIF2alfa quinasas en las células de *S. pombe* mejora su capacidad de supervivencia en respuesta a otras situaciones de estrés como la presencia de hidroxiiurea o de rapamicina en el medio.



## **Conclusiones**

***“Todo aquello que logran o dejan de lograr en su vida, es el resultado directo de sus pensamientos”.***

***James Allen.***



### CONCLUSIONES:

1- Las eIF2alfa quinasas de *Schizosaccharomyces. Pombe* responden de forma diferencial a distintas situaciones de estrés: a) Hri1, está implicada en los mecanismos moleculares de respuesta a la falta de nutrientes en la fase estacionaria de crecimiento y a la ausencia de nitrógeno; b) Hri2, responde al choque térmico y en condiciones de limitación de glucosa; c) Gcn2, responde al estrés oxidativo, a la presencia del agente genotóxico MMS y a la ausencia de nitrógeno.

2- Las rutas de la MAPK Sty1 y de las eIF2alfa quinasas están coordinadas en las situaciones de estrés oxidativo y de ausencia de nitrógeno.

3- El estrés oxidativo y el choque térmico promueven cambios en la expresión de las eIF2alfa quinasas tanto en la cantidad de ARNm como de proteína.

4- La actividad de Gcn2 y la fosforilación de eIF2alfa: a) favorecen la supervivencia celular en las situaciones de estrés oxidativo, baja disponibilidad de glucosa y choque térmico; b) participan en la regulación de la parada del ciclo celular en la fase G1, en la situación de ausencia de nitrógeno.

5- La fosforilación del factor eIF2 está implicada en la activación de procesos relacionados con la diferenciación sexual y la esporulación.





## **Bibliografía**

*“Todas las verdades son fáciles de saber una vez han sido descubiertas”.*

*Galileo.*



## A

- Abraham, N., Stojdl, D. F., Duncan, P. I., Methot, N., Ishii, T., Dube, M., Vanderhyden, B. C., Atkins, H. L., Gray, D. A., McBurney, M. W., Koromilas, A. E., Brown, E. G., Sonenberg, N., & Bell, J. C. 1999. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9): 5953-5962.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3<sup>rd</sup> ed. Garland publishing. Nueva York. USA.
- Asano, K., Krishnamoorthy, T., Phan, L., Pavitt, G. D., & Hinnebusch, A. G. 1999. Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *The EMBO Journal*, 18(6): 1673-1688.
- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., & Hinnebusch, A. G. 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA (Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & Development*, 14(19): 2534-2546.
- Asp, E., & Sunnerhagen, P. 2003. Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in *Schizosaccharomyces pombe*, interact with the MAP kinase Sty1. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 268(5): 585-597.

## B

- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3<sup>rd</sup>, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 14(10): 943-951.
- Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R. A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. 1998. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell*, 93(7): 1105-1115.
- Beckmann, R., Spahn, C. M., Frank, J., & Blobel, G. 2001. The active 80S ribosome-Sec61 complex. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 66: 543-554.
- Berlanga, J. J., Santoyo, J., & De Haro, C. 1999. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 265(2): 754-762.
- Berlanga, J. J., Ventoso, I., Harding, H. P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L., & de Haro, C. 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *The EMBO Journal*, 25(8): 1730-1740.

- Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., & Posas, F. 2000. Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11): 3887-3895.
- Blanco, M. A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J. M., & Moreno, S. 2000. APC (ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 19(15): 3945-3955.
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., & Gustin, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102): 1760-1763.
- Brickwood, S., Bonthron, D. T., Al-Gazali, L. I., Piper, K., Hearn, T., Wilson, D. I., & Hanley, N. A. 2003. Wolcott-Rallison syndrome: pathogenic insights into neonatal diabetes from new mutation and expression studies of EIF2AK3. *Journal of Medical Genetics*, 40(9): 685-689.
- Bueno, A., Richardson, H., Reed, S. I., & Russell, P. 1991. A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell*, 66(1): 149-159.

## C

- Chen, J. J. 2000. Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase. "Translational Control of Gene Expression". (edit. Sonenberg, N., Hershey, J. y Mathews, M.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York. 529-546.
- Clemens, M. J. 2004. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*, 23(18): 3180-3188.
- Cole, J. L. 2007. Activation of PKR: an open and shut case? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(2): 57-62.
- Correa-Bordes, J., & Nurse, P. 1995. p25<sup>rum1</sup> orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34<sup>cdc2</sup> mitotic kinase. *Cell*, 83(6): 1001-1009.

## D

- de Haro, C., Mendez, R., & Santoyo, J. 1996. The eIF-2 $\alpha$  kinases and the control of protein synthesis. *The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(12): 1378-1387.
- De Veylder, L., Beeckman, T., & Inze, D. 2007. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 8(8): 655-665.
- Degols, G., Shiozaki, K., & Russell, P. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6): 2870-2877.

- Degols, G., & Russell, P. 1997. Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6): 3356-3363.
- Delepine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G. M., & Julier, C. 2000. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nature Genetics*, 25(4): 406-409.
- Deng, J., Harding, H. P., Raught, B., Gingras, A. C., Berlanga, J. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ron, D., & Sonenberg, N. 2002. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Current Biology : CB*, 12(15): 1279-1286.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P., & Ron, D. 2004. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23): 10161-10168.
- Dever, T. E. 1999. Translation initiation: adept at adapting. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(10): 398-403.
- Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108(4): 545-556.
- Devlin, T. 2002. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Library of congress. Nueva York. USA.
- Dohlman, H. G., & Thorner, J. 1997. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(7): 3871-3874.
- Dolznig, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H., & Mullner, E. W. 2004. Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nature Cell Biology*, 6(9): 899-905.
- Dunand-Sauthier, I., Walker, C. A., Narasimhan, J., Pearce, A. K., Wek, R. C., & Humphrey, T. C. 2005. Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryotic Cell*, 4(11): 1785-1793.

## E

- Egel, R. 2000. Fission yeast on the brink of meiosis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(9): 854-860.
- Egel, R. 2004. Fission yeast in general genetics. "The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, genomics and beyond". Ed. Richard Egel. Springer-Verlag Belín. Heidelberg. Alemania. 1-12.

## F

- Fingar, D. C., & Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23(18): 3151-3171.
- Flynn, A., Shatsky, I. N., Proud, C. G., & Kaminski, A. 1994. The RNA-binding properties of protein synthesis initiation factor eIF-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219(2): 293-301.
- Forsburg, S. L., & Nurse, P. 1991. Identification of a G1-type cyclin *puc1+* in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 351(6323): 245-248.

## G

- Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K., & Russell, P. 1998. Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes & Development*, 12(10): 1464-1473.
- Gallie, D. R. 1998. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*, 216(1): 1-11.
- Gaspar, N. J., Kinzy, T. G., Scherer, B. J., Humbelin, M., Hershey, J. W., & Merrick, W. C. 1994. Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the gamma-subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(5): 3415-3422.
- Gil, J., Garcia, M. A., Gomez-Puertas, P., Guerra, S., Rullas, J., Nakano, H., Alcami, J., & Esteban, M. 2004. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10): 4502-4512.
- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of Biochemistry*, 68: 913-963.
- Grundmann, O., Mosch, H. U., & Braus, G. H. 2001. Repression of GCN4 mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28): 25661-25671.

## H

- Hamanaka, R. B., Bennett, B. S., Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. 2005. PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 16(12): 5493-5501.

- Han, A. P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S. H., & Chen, J. J. 2001. Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *The EMBO Journal*, 20(23): 6909-6918.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4): 557-580.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(8): 576-596.
- Hao, S., Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., McDaniel, B. J., Anthony, T. G., Wek, R. C., Cavener, D. R., McGrath, B. C., Rudell, J. B., Koehnle, T. J., & Gietzen, D. W. 2005. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science*, 307(5716): 1776-1778.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716): 271-274.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5): 1099-1108.
- Herrero, S. 2000. Clonaje y caracterización de nuevas eIF2  $\alpha$  quinasas reguladas por hemina. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Hershey, J. W. 1991. Translational control in mammalian cells. *Annual review of Biochemistry*, 60: 717-755.
- Hinnebusch, A. G. 1997. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35): 21661-21664.
- Hinnebusch, A. G. 2000. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. *Translational Control of Gene Expression*. (edit. Sonenberg, N., Hershey, J. y Mathews, M.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York. 185-243.
- Hinnebusch, A. G. 2011. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 75(3): 434-467.
- Hinnebusch, A.G., Dever, T. E. & Asano, K. 2007. Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. M. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey (ed), *Translation control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 225-268.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 66(2): 300-372.

## I

- Ikner, A., & Shiozaki, K. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*, 569(1-2): 13-27.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1): 23-28.
- Ishii, T., Kwon, H., Hiscott, J., Mosialos, G., & Koromilas, A. E. 2001. Activation of the I kappa B alpha kinase (IKK) complex by double-stranded RNA-binding defective and catalytic inactive mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *Oncogene*, 20(15): 1900-1912.

## J

- Jiang, H. Y., & Wek, R. C. 2005. GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *The Biochemical Journal*, 385(Pt 2): 371-380.
- Jiang, H. Y., Wek, S. A., McGrath, B. C., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Cavener, D. R., & Wek, R. C. 2003. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16): 5651-5663.
- Jorgensen, P., & Tyers, M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Current Biology: CB*, 14(23): R1014-1027.

## K

- Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y., & Yamamoto, M. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* gad7<sup>+</sup> encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1(4): 391-408.
- Kaufman, R. 2000. The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. M. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey (ed), *Translation control of gene expresion*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 503-527.
- Kawai, M., Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H., & Uritani, M. 2001. Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Current Genetics*, 39(3): 166-174.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2): 163-175.



- Kjaerulff, S., Lautrup-Larsen, I., Truelsén, S., Pedersen, M., & Nielsen, O. 2005. Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals *stel1* as a mitogen-activated protein kinase target. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5): 2045-2059.
- Kjaerulff, S., Andersen, N. R., Borup, M. T., & Nielsen, O. 2007. Cdk phosphorylation of the *Stel1* transcription factor constrains differentiation-specific transcription to G1. *Genes & Development*, 21(3): 347-359.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E., & Hinnebusch, A. G. 2001. Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15): 5018-5030.
- Krohn, M., Skjölberg, H. C., Soltani, H., Grallert, B., & Boye, E. 2008. The G1-S checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 24): 4047-4054.

## L

- Laurino, J. P., Thompson, G. M., Pacheco, E., & Castilho, B. A. 1999. The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1): 173-181.
- Lawrence, C. L., Maekawa, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R., & Jones, N. 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8): 5160-5170.
- Lemaire, P. A., Anderson, E., Lary, J., & Cole, J. L. 2008. Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *Journal of Molecular Biology*, 381(2): 351-360.
- Leupold, F. 1950. [Simplified micromethod for quantitative determination of plasmin in serum]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 285(4-5): 216-219.
- Linder, P. (1893), Forsburg Lab *pombe* Pages: *S. pombe* history. [www-rcf.usc.edu](http://www-rcf.usc.edu)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Loewith, R., Hubberstey, A., & Young, D. 2000. Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 1): 153-160.
- Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A. L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J. B., & Aligue, R. 2005. Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated *Srk1* kinase in fission yeast. *Molecular Cell*, 17(1): 49-59.

- Lopez-Aviles, S., Lambea, E., Moldon, A., Grande, M., Fajardo, A., Rodriguez-Gabriel, M. A., Hidalgo, E., & Aligue, R. 2008. Activation of *Srk1* by the mitogen-activated protein kinase *Sty1/Spcl* precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 19(4): 1670-1679.
- Lu, L., Han, A. P., & Chen, J. J. 2001. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23): 7971-7980.

## M

- MacIver, F. H., Tanaka, K., Robertson, A. M., & Hagan, I. M. 2003. Physical and functional interactions between polo kinase and the spindle pole component *Cut12* regulate mitotic commitment in *S. pombe*. *Genes & Development*, 17(12): 1507-1523.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Perez, P., Gacto, M., & Cansado, J. 2006. Stress-induced response, localization, and regulation of the *Pmk1* cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(4): 2033-2043.
- Madrid, M., Nunez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. 2007. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase *Pmk1p* by protein phosphatases. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11): 4405-4419.
- Mark, W., & Jones, N. 2004. Stress response in *S. pombe*, en “The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, genomics and beyond” ed. Richard Egel. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Alemania. 57-72.
- Marshall, C. J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current opinion in Genetics & Development*, 4(1): 82-89.
- Martin, S. G. 2009. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in Cell Biology*, 19(9): 447-454.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M. A., de Prada, J. M., & Moreno, S. 2000. The *puc1* cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2): 543-554.
- Maurin, A. C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H. P., Ron, D., & Fafournoux, P. 2005. The *GCN2* kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metabolism*, 1(4): 273-277.
- Millar, J. B., Lenaers, G., & Russell, P. 1992. *Pyp3* PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *The EMBO Journal*, 11(13): 4933-4941.

- Millar, J. B., Buck, V., & Wilkinson, M. G. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*, 9(17): 2117-2130.
- Mitchison, J. M. 1990. The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BioEssays : News and reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 12(4): 189-191.
- Mitchison, J. M. 2003. Growth during the cell cycle. *International review of Cytology*, 226: 165-258.
- Moreno, S., Klar, A., & Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*, 194: 795-823.
- Moreno, S., & Nurse, P. 1994. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1+ gene. *Nature*, 367(6460): 236-242.
- Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., & Takegawa, K. 2010. Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS letters*, 584(7): 1327-1334.
- Mulvihill, D. P., Petersen, J., Ohkura, H., Glover, D. M., & Hagan, I. M. 1999. Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(8): 2771-2785.

## N

- Nakagawa, C. W., Yamada, K., & Mutoh, N. 1999. Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximide and hydrogen peroxide. *FEMS Microbiology letters*, 173(2): 373-378.
- Nakagawa, C. W., Yamada, K., & Mutoh, N. 2000. Role of Atf1 and Pap1 in the induction of the catalase gene of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biochemistry*, 127(2): 233-238.
- Nakashima, A., Hasegawa, T., Mori, S., Ueno, M., Tanaka, S., Ushimaru, T., Sato, S., & Uritani, M. 2006. A starvation-specific serine protease gene, isp6+, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics*, 49(6): 403-413.
- Nakashima, A., Sato, T., & Tamanoi, F. 2010. Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 5): 777-786.
- Narasimhan, J., Staschke, K. A., & Wek, R. C. 2004. Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22): 22820-22832.
- Nasim, A., Young, P., & Johnson, B. 1989. *Molecular Biology of the fission yeast*. Academy Press, San Diego.

- Neely, L. A., & Hoffman, C. S. 2000. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17): 6426-6434.
- Neiman, A. M., Stevenson, B. J., Xu, H. P., Sprague, G. F., Jr., Herskowitz, I., Wigler, M., & Marcus, S. 1993. Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Molecular Biology of the Cell*, 4(1): 107-120.
- Nguyen, A. N., & Shiozaki, K. 1999. Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes & Development*, 13(13): 1653-1663.
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., & Shiozaki, K. 2000. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4): 1169-1181.
- Nurse, P. 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256(5518): 547-551.
- Nurse, P., & Bissett, Y. 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292(5823): 558-560.

## O

- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. 1999. A fission yeast gene (*prr1(+)*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *Journal of Biochemistry*, 125(6): 1061-1066.
- Ohmiya, R., Yamada, H., Kato, C., Aiba, H., & Mizuno, T. 2000. The Prr1 response regulator is essential for transcription of *stell1+* and for sexual development in fission yeast. *Molecular & General Genetics: MGG*, 264(4): 441-451.
- Otsubo, Y., & Yamamoto, M. 2008. TOR signaling in fission yeast. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4): 277-283.

## P

- Paulin, F. E., Campbell, L. E., O'Brien, K., Loughlin, J., & Proud, C. G. 2001. Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Current Biology : CB*, 11(1): 55-59.
- Pestova, T. V., Lorsch J. R. & Hellen C. U. T. 2007. The mechanism of translation initiation in eukaryotes. M. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey (ed),

Translation control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 87-128.

- Petersen, J., & Hagan, I. M. 2005. Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature*, 435(7041): 507-512.
- Petersen, J., & Nurse, P. 2007. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature Cell Biology*, 9(11): 1263-1272.
- Pomar, N., Berlanga, J. J., Campuzano, S., Hernandez, G., Elias, M., & de Haro, C. 2003. Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 270(2): 293-306.
- Prevot, D., Darlix, J. L., & Ohlmann, T. 2003. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 95(3-4): 141-156.
- Proud, C. G. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(1): 3-12.

## Q

- Qiu, H., Garcia-Barrio, M. T., & Hinnebusch, A. G. 1998. Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5): 2697-2711.
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., & Toone, W. M. 2002. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3): 805-816.

## R

- Raught, B., Gingras, A., & Sonenberg. 2000. Regulation of ribosomal recruitment in eucaryotes. M. Mathews, N. Sonnenberg, and J. W. B. Hershey (ed), *Translation control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 245-293.
- Rhind, N., & Russell, P. 1998. Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6): 749-758.

- Rodriguez-Gabriel, M. A., & Russell, P. 2005. Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 4(8): 1396-1402.
- Ron, D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(10): 1383-1388.
- Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. 2009. Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS Genetics*, 5(3): e1000408.
- Rowlands, A. G., Panniers, R., & Henshaw, E. C. 1988. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(12): 5526-5533.
- Russell, P., & Nurse, P. 1987a. The mitotic inducer nim1+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell*, 49(4): 569-576.
- Russell, P., & Nurse, P. 1987b. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49(4): 559-567.

## S

- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2<sup>a</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C., & Hidalgo, E. 2008. Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic Cell*, 7(5): 826-835.
- Santoyo, J., Alcalde, J., Mendez, R., Pulido, D., & de Haro, C. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2alpha (eIF-2alpha) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(19): 12544-12550.
- Sattlegger, E., Hinnebusch, A. G., & Barthelmess, I. B. 1998. cpc-3, the *Neurospora crassa* homologue of yeast GCN2, encodes a polypeptide with juxtaposed eIF2alpha kinase and histidyl-tRNA synthetase-related domains required for general amino acid control. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32): 20404-20416.
- Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J., & Young, D. 1997. Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7): 3508-3519.
- Shi, Y., Vattem, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., & Wek, R. C. 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-

- subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12): 7499-7509.
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., & Millar, J. B. 1998. The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 9(2): 311-322.
  - Shiozaki, K., & Russell, P. 1995a. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*, 378(6558): 739-743.
  - Shiozaki, K., & Russell, P. 1995b. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *The EMBO Journal*, 14(3): 492-502.
  - Shiozaki, K., & Russell, P. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & Development*, 10(18): 2276-2288.
  - Shiozaki, K., Shiozaki, M., & Russell, P. 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Molecular Biology of the Cell*, 8(3): 409-419.
  - Shiozaki, K., Shiozaki, M., & Russell, P. 1998. Heat stress activates fission yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 9(6): 1339-1349.
  - Sood, R., Porter, A. C., Ma, K., Quilliam, L. A., & Wek, R. C. 2000. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *The Biochemical Journal*, 346 Pt 2: 281-293.
  - Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S., & Fantes, P. 1996. The wis1 signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 109 ( Pt 7): 1927-1935.
  - Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. 1991. *Schizosaccharomyces pombe* stel1+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes & Development*, 5(11): 1990-1999.
  - Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., & Kuno, T. 1998. pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *The EMBO Journal*, 17(1): 140-148.
  - Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H., & Kuno, T. 1999. The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*, 399(6735): 479-483.



## T

- Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T., & Sugiura, R. 2007. Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12): 4794-4802.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., & Jones, N. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* atf1<sup>+</sup> encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *The EMBO Journal*, 14(24): 6193-6208.
- Thompson, G. M., Pacheco, E., Melo, E. O., & Castilho, B. A. 2000. Conserved sequences in the beta subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2gamma. *The Biochemical Journal*, 347 Pt 3: 703-709.
- Toda, T., Shimanuki, M., & Yanagida, M. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes & Development*, 5(1): 60-73.
- Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y., & Yanagida, M. 1992. Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12): 5474-5484.
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., & Jones, N. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spcl. *Genes & Development*, 12(10): 1453-1463.
- Tvegard, T., Soltani, H., Skjolberg, H. C., Krohn, M., Nilssen, E. A., Kearsey, S. E., Grallert, B., & Boye, E. 2007. A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes & Development*, 21(6): 649-654.

## U

- Uma, S., Hartson, S. D., Chen, J. J., & Matts, R. L. 1997. Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2alpha kinase to acquire and maintain an activable conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17): 11648-11656.
- Uma, S., Thulasiraman, V., & Matts, R. L. 1999. Dual role for Hsc70 in the biogenesis and regulation of the heme-regulated kinase of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9): 5861-5871.



- Uma, S., Matts, R. L., Guo, Y., White, S., & Chen, J. J. 2000. The N-terminal region of the heme-regulated eIF2alpha kinase is an autonomous heme binding domain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(2): 498-506.

### V

- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayte, J., & Hidalgo, E. 2004. Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Molecular Microbiology*, 52(5): 1427-1435.
- Vivancos, A. P., Jara, M., Zuin, A., Sanso, M., & Hidalgo, E. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 276(6): 495-502.

### W

- Wang, L. Y., Shimada, K., Morishita, M., & Shiozaki, K. 2005. Response of fission yeast to toxic cations involves cooperative action of the stress-activated protein kinase Spc1/Styl and the Hal4 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(10): 3945-3955.
- Warbrick, E., & Fantes, P. A. 1991. The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal*, 10(13): 4291-4299.
- Waskiewicz, A. J., & Cooper, J. A. 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6): 798-805.
- Weisman, R., & Choder, M. 2001. The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10): 7027-7032.
- Weisman, R. 2004. The fission yeast TOR proteins and the rapamycin response: an unexpected tale. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 279: 85-95.
- Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T., & Kupiec, M. 2005. Regulation of leucine uptake by tor1+ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics*, 169(2): 539-550.
- Wek, R. C. 1994. eIF-2 kinases: regulators of general and gene-specific translation initiation. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(11): 491-496.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., & Jones, N. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Styl

stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & Development*, 10(18): 2289-2301.

- Willer, M., Hoffmann, L., Styrkarsdottir, U., Egel, R., Davey, J., & Nielsen, O. 1995. Two-step activation of meiosis by the *mat1* locus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(9): 4964-4970.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritze, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G., & Nurse, P. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874): 871-880.
- Wu, S., Hu, Y., Wang, J. L., Chatterjee, M., Shi, Y., & Kaufman, R. J. 2002. Ultraviolet light inhibits translation through activation of the unfolded protein response kinase PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20): 18077-18083.

## Y

- Yamamoto, M. 1996. Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Structure and Function*, 21(5): 431-436.
- Yanagida, M. 2009. Cellular quiescence: are controlling genes conserved? *Trends in Cell Biology*, 19(12): 705-715.

- Yang, Y. L., Reis, L. F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., Williams, B. R., Aguet, M., & Weissmann, C. 1995. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *The EMBO Journal*, 14(24): 6095-6106.

## Z

- Zaitsevskaya-Carter, T., & Cooper, J. A. 1997. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *The EMBO Journal*, 16(6): 1318-1331.
- Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A., & Williams, B. R. 2000. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4): 1278-1290.
- Zhan, K., Vattem, K. M., Bauer, B. N., Dever, T. E., Chen, J. J., & Wek, R. C. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20): 7134-7146.
- Zhan, K., Narasimhan, J., & Wek, R. C. 2004. Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 168(4): 1867-1875.
- Zuin, A., Vivancos, A. P., Sanso, M., Takatsume, Y., Ayte, J., Inoue, Y., & Hidalgo, E. 2005. The glycolytic metabolite methylglyoxal activates Pap1 and Sty1 stress responses in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(44): 36708-36713.
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I. A., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., Park, H. O., Hayles, J., Ayte, J., & Hidalgo, E. 2008. Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PloS One*, 3(7): e2842.
- Zuin, A., Carmona, M., Morales-Ivorra, I., Gabrielli, N., Vivancos, A. P., Ayte, J., & Hidalgo, E. 2010. Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *The EMBO Journal*, 29(5): 981-991.



**Anexo**



# Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Sty1 in Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$ Kinases in Response to Environmental Stress in *Schizosaccharomyces pombe*<sup>∇</sup>

Juan José Berlanga,<sup>1†</sup> Damariz Rivero,<sup>2†</sup> Ruth Martín,<sup>1†</sup> Saturnino Herrero,<sup>3</sup>  
Sergio Moreno,<sup>4</sup> and César de Haro<sup>1\*</sup>

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain<sup>1</sup>; Department of Pharmacology, University of Florence, Florence, Italy<sup>2</sup>; Institute of Applied Biosciences, Department of Applied Microbiology, University of Karlsruhe, Karlsruhe, Germany<sup>3</sup>; and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-USAL, Salamanca, Spain<sup>4</sup>

Received 24 June 2009/Accepted 17 October 2009

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) Sty1 is essential for the regulation of transcriptional responses that promote cell survival in response to different types of environmental stimuli in *Schizosaccharomyces pombe*. In fission yeast, three distinct eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) kinases, two mammalian HRI-related protein kinases (Hri1 and Hri2) and the Gcn2 ortholog, regulate protein synthesis in response to cellular stress conditions. In this study, we demonstrate that both Hri1 and Hri2 exhibited an autokinase activity, specifically phosphorylated eIF2 $\alpha$ , and functionally replaced the endogenous *Saccharomyces cerevisiae* Gcn2. We further show that Gcn2, but not Hri1 or Hri2, is activated early after exposure to hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate (MMS). Cells lacking Gcn2 exhibit a later activation of Hri2. The activated MAPK Sty1 negatively regulates Gcn2 and Hri2 activities under oxidative stress but not in response to MMS. In contrast, Hri2 is the primary activated eIF2 $\alpha$  kinase in response to heat shock. In this case, the activation of Sty1 appears to be transitory and does not contribute to the modulation of the eIF2 $\alpha$  kinase stress pathway. In strains lacking Hri2, a type 2A protein phosphatase is activated soon after heat shock to reduce eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Finally, the MAPK Sty1, but not the eIF2 $\alpha$  kinases, is essential for survival upon oxidative stress or heat shock, but not upon MMS treatment. These findings point to a regulatory coordination between the Sty1 MAPK and eIF2 $\alpha$  kinase pathways for a particular range of stress responses.

Global inhibition of protein synthesis is widely considered as a response of biological systems to stress conditions. However, it is becoming increasingly recognized that translation is not completely inhibited and that translational control of specific mRNAs is required for survival during growth under stress conditions (38, 47). In eukaryotic cells, the reversible phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) is a well-characterized mechanism of translational control in response to a wide variety of cellular stresses (7, 12).

Four mammalian protein kinases that inhibit translation initiation by phosphorylating eIF2 $\alpha$  on Ser-51 have been identified. They are regulated independently in response to various different cellular stresses (12, 39). Thus, heme-regulated inhibitor (HRI) is activated both by heme deficiency and under conditions of heat shock and oxidative stress (28). Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is induced by interferon and activated by double-stranded RNA during viral infection (23). General control nonderepressible-2 (GCN2) is an eIF2 $\alpha$  kinase that is activated by amino acid or serum

deprivation, UV irradiation, and viral RNAs (3, 4, 10, 19). PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK, also known as PEK) is activated by unfolded proteins in the ER (16, 44).

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Gcn2 is the sole eIF2 $\alpha$  kinase (12). It is activated in response to a variety of conditions, including nutrient starvation (amino acids, purines, and glucose) and exposure to hydroperoxides, sodium chloride, and rapamycin (20, 29). In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, besides Gcn2, two additional eIF2 $\alpha$  kinases related to mammalian HRI, called Hri1 and Hri2, phosphorylate eIF2 $\alpha$  at serine 51 (serine 52 in *S. pombe*). Hri1 and Hri2 showed a differential activation pattern in response to cellular stresses (52).

It is well known that eIF2 $\alpha$  phosphorylation can regulate both gene-specific and general translation. Thus, the eIF2 $\alpha$  kinases phosphorylate eIF2 $\alpha$ , leading to the inhibition of eIF2B activity. This fact produces a marked decrease in the levels of ternary complex eIF2-GTP-*tRNA*<sub>i</sub><sup>Met</sup>, resulting in reduced general translation and increased translation of the transcription factors, Gcn4 in *S. cerevisiae* and ATF4 in mammals, which activate expression of their target genes involved in the stress response (15, 18). Paradoxically, *S. pombe* does not have a Gcn4 homologue. However, other related transcription factors may facilitate its eIF2 $\alpha$  kinase-mediated stress response.

Despite the finding that phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is a general response to cellular stress, it is well known that, in *S.*

\* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, c/Nicolás Cabrera 1, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-1964507. Fax: 34-91-1964420. E-mail: cdeharo@cbm.uam.es.

† J.J.B., D.R., and R.M. contributed equally to this study.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 30 October 2009.

TABLE 1. *S. pombe* strains

Strain	Genotype	Source
PN1	972 <i>h</i> <sup>−</sup>	P. Nurse
PN22	<i>leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	P. Nurse
Δ <i>hri1</i>	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>hri2</i>	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>gcn2</i>	<i>gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>−</sup>	This study
IH2194	<i>dis2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	I. Álvarez
IH1233	<i>ppa2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	I. Álvarez
S1017	<i>rad3::ura4<sup>+</sup> ade6 leu h</i> <sup>−</sup>	T. Carr
S652	<i>spc1::HA6His [ura4<sup>+</sup>] ura4-d18 leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	S. Moreno
Δ <i>sty1</i>	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	E. Hidalgo
Δ <i>pyp1</i>	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 leu1-32 h</i> <sup>−</sup>	E. Hidalgo
Δ <i>hri1</i> Δ <i>hri2</i>	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>−</sup>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>gcn2</i>	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>−</sup>	This study
Δ <i>hri2</i> Δ <i>gcn2</i>	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>hri2</i> Δ <i>dis2</i>	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> dis2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>hri2</i> Δ <i>ppa2</i>	<i>hri2::ura4<sup>+</sup> ppa2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>hri2</i> Δ <i>gcn2</i>	<i>hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18 h</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>hri2</i> Δ <i>sty1</i>	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>gcn2</i> Δ <i>sty1</i>	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Δ <i>hri2</i> Δ <i>gcn2</i> Δ <i>sty1</i>	<i>spc1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>hri2</i> Δ <i>pyp1</i>	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Δ <i>hri1</i> Δ <i>gcn2</i> Δ <i>pyp1</i>	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> hri1::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Δ <i>hri2</i> Δ <i>gcn2</i> Δ <i>pyp1</i>	<i>pyp1::ura4<sup>+</sup> hri2::ura4<sup>+</sup> gcn2::ura4<sup>+</sup> ura4-d18</i>	This study
Hri1-HA	<i>hri1::hri1-HA/Kan<sup>r</sup></i>	This study
Hri2-HA	<i>hri2::hri2-HA/Kan<sup>r</sup></i>	This study
Gcn2-HA	<i>gcn2::gcn2-HA/Kan<sup>r</sup></i>	This study

*pombe*, cellular responses to various environmental stresses are regulated primarily through the stress-activated mitogen-activated protein kinase (MAPK) Sty1. The Sty1 protein (also known as Spc1 or Phh1) is a member of the stress-activated protein kinase (SAPK) family, which includes Hog1 from *S. cerevisiae* and the mammalian SAPKs, p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK), and can be activated by heat shock, high osmolarity stress, nutrient depletion, and oxidative stress (22, 50). Upon stress activation, Sty1 reversibly accumulates in the nucleus, where it stimulates gene expression via the Atf1 transcription factor. Thus, in response to the stress stimuli, Sty1 is required for the transcriptional regulation of a large set of genes that constitute the core environmental stress response (CESR) (5). For the majority of these genes, regulation is also dependent on Atf1 (46, 48, 51). Phosphorylation of Atf1 by Sty1 upon stress activation has been demonstrated both in vitro (51) and in vivo (46).

Previous studies showed that Sty1 is important for survival when cells are exposed to hydrogen peroxide (6, 13, 40, 41). Also, it was previously observed that the growth of Sty1 mutant cells was defective at high temperatures (32). On the other hand, more recently it has been reported that in *S. cerevisiae*, whereas mutants lacking Gcn4 were sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the Gcn2 mutant was no more sensitive than the wild-type to peroxides in spot tests (29).

In a previous report, it was suggested that downstream components of the SAPK pathway can contribute both positively and negatively to the modulation of the eIF2α kinase stress pathway (13). However, the relationship between the highly conserved SAPK pathway and the translational machinery in fission yeast remains to be elucidated. Here, we further investigate the participation of each eIF2α kinase in the fission yeast translational program in response to stress. Our data show

that, upon distinct cellular stresses, phosphorylation of eIF2α constitutes a very early response. Interestingly, a particular eIF2α kinase is activated in response to each stress stimuli. Thus, Hri2 responds to heat shock, whereas Gcn2 is activated early after exposure to hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate (MMS) in *S. pombe*. In addition, some analyses reveal a strong correlation between changes in mRNA and protein levels of the distinct eIF2α kinases in response to oxidative stress and heat shock. Finally, we found a striking relationship between the MAPK Sty1 and the eIF2α kinase family under some, but not all, of the stress conditions in fission yeast.

MATERIALS AND METHODS

**Yeast strains and growth conditions.** The *S. pombe* strains used in the present study are listed in Table 1. Deletion of *hri1*<sup>+</sup> and *hri2*<sup>+</sup> from the *S. pombe* strains was generated by homologous recombination transforming linear DNA containing *ura4*<sup>+</sup> replacing the entire coding region of *hri1*<sup>+</sup> and *hri2*<sup>+</sup>. Transformants were selected for growth in minimal medium lacking uracil. The *hri1* and *hri2* knockouts were confirmed by Southern blotting. The opposing mating types of Δ*hri1* and Δ*hri2* strains were mated to each other and with Δ*gcn2*, Δ*spc1*, Δ*pyp1*, Δ*dis2*, and Δ*ppa2*. The double- and triple-mutant strains were obtained after sporulation and tetrad analysis, and genotypes were confirmed by PCR analysis. The *S. pombe* strains Hri1-HA, Hri2-HA, and Gcn2-HA, expressing endogenous Hri1-, Hri2-, and Gcn2-tagged proteins bearing 3 copies of the influenza virus hemagglutinin (HA) epitope, were constructed as previously described (1). *S. pombe* strains were routinely grown with shaking at 32°C in yeast extract plus supplements medium (YES; Bio 101) with all 20 amino acids (225 g/ml) or on agar plates at the same temperature. The addition of the amino acids to the YES medium assures minimal phosphorylation of eIF2α in nonstressed conditions. Sporulation tests were performed using solid malt extract agar medium (MEA; Difco).

**Prokaryotic expression and affinity purification of Hri1 and Hri2 proteins.** Plasmids pRSETB-Hri1 and the pRSETB-Hri2 encoding His-tagged Hri1 and Hri2 proteins were used to transform a competent BL21(DE3)/pLys S strain of



*E. coli*. Protein expression, bacterial lysis, and His-tagged protein purification were carried out as previously described (2).

**Growth assay in *S. cerevisiae*.** Strains J80 (*MATa gcn2Δ ura3-52 trp1-Δ63 Δsui2 [SUI2-LEU2]*) and J82 (*MATa gcn2Δ ura3-52 trp1-Δ63 Δsui2 [SUI2-S51A LEU2]*) were used. Cells were transformed with empty pEMBLyex4 and PYX212 vectors or with the same plasmids encoding *S. cerevisiae* Gcn2 or *S. pombe* Hri1 and Hri2. The transformation of cells was carried out by using an improved lithium acetate procedure (14). Transformant cells were grown on plates containing SD medium complemented with amino acids (SD+aa) or SD medium plus 3-aminotriazole (SD+3-AT) to elicit histidine starvation conditions. Plates were incubated at 30°C for 3 days before being photographed.

**In vitro phosphorylation assays.** The eluted proteins from the metal affinity resin or immune complexes were assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$  as reported previously (30, 42), with modifications as described. In a total volume of 20  $\mu$ l, 5- $\mu$ l portions of kinase fractions were incubated for 30 min at 30°C in kinase buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM magnesium acetate, 0.25 mg of bovine serum albumin/ml, 50  $\mu$ M ATP) containing purified His-tagged human eIF2 $\alpha$  (0.5  $\mu$ g) and 3  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3,000 Ci/mmol). Incubations were terminated by the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer, and phosphoproteins were analyzed by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel (28.5:1 [wt/wt] acrylamide-bisacrylamide) (26), followed by autoradiography using Agfa Curix RP2 film and an Amersham-Pharmacia Bio-tech intensifying screen.

**Stress assays.** The yeast cells were grown to an optical density at 595 nm (OD<sub>595</sub>) of 0.7 and subjected to stress. Oxidative stress was produced by adding 1.5 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to the medium for different time periods. DNA damage-induced stress was produced by treatment with the DNA alkylating agent MMS at a concentration of 0.02% for times ranging from 15 to 60 min. For heat shock experiments, cells were collected by centrifugation, resuspended in medium previously warmed at 40 or 48°C, and incubated for different time periods at the same temperature; when indicated, cells were incubated in the presence of 20  $\mu$ M okadaic acid for 6 h before the stress treatment. At the end of the stress treatment the cells were collected by centrifugation at 3,000  $\times$  g for 3 min and frozen immediately on dry ice. The pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 40 mM glycerol 2-phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 25  $\mu$ g of DNase/ml, and a protease inhibitor cocktail [Complete EDTA-free; Roche]) and broken in the presence of acid-washed glass beads (425 to 600  $\mu$ m; Sigma) by using a FastPrep FP120 homogenizer (Bio 101), in four cycles of 40 s to a power of 6. The lysates were clarified by centrifugation at 12,000  $\times$  g at 4°C for 15 min and stored at -70°C. Protein determination was performed by using a Bio-Rad protein assay according to the manufacturer's instructions. For the stress experiments on plates, cells were grown as described above and diluted in order to plate different amounts of cells ranging from 10 to 10<sup>6</sup>. For oxidative stress, cells were grown at 32°C for 48 h in the absence or the presence of 0.2, 0.75, or 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For heat shock, cells were incubated the first 24 h at 40°C and then at 32°C for an additional 48 h.

**Immunoprecipitation, SDS-PAGE, and immunoblotting.** For immunoprecipitation, cell lysates containing 10 mg of total protein were incubated for 3 h at 4°C with 10  $\mu$ g of anti-HA monoclonal antibody (Covance) and protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). After extensive washing with lysis buffer, the immune complexes were equilibrated in kinase buffer and assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$ . For the analysis of the presence of phosphoproteins in cell lysates, an aliquot of 50 or 100  $\mu$ g of each protein sample was separated by electrophoresis on SDS-PAGE (10% acrylamide, 0.26% bisacrylamide). The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon; Millipore) and sequentially probed with rabbit anti-eIF2 $\alpha$  (Santa Cruz), rabbit anti-eIF2 $\alpha$ -P (Cell Signaling), and rabbit anti-p38-P (Cell Signaling), followed by rabbit secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Promega). After extensive washing, the immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech). The relative intensities of bands were quantified by using a GS-710 densitometer (Bio-Rad) with the QuantityOne program. In order to determine the ratio between the values obtained in the treated samples with respect to the control, both values were divided by the control, assuming that the control has a value of 1.

**Sty1 overexpression in different *S. pombe* strains.** Wild-type (PN22) and  $\Delta$ sty1 strains were transformed by using the lithium acetate procedure (33) with plasmid pSty1.41x (a gift from Jonathan Millar), encoding a HA- and His<sub>6</sub>-tagged version of the Sty1 protein under the control of the *nmf1* (41x) promoter. For Sty1-HA-His<sub>6</sub> expression, cells were grown in Edinburgh minimal medium

(EMM) alone or EMM supplemented with 0.5  $\mu$ M thiamine to repress the expression from the *nmf1* promoter.

**RNA extraction, RT, and real-time PCR.** Cells were grown to an OD<sub>595</sub> of 0.7 and either subjected or not subjected to stress conditions, as described above. A total of 5  $\times$  10<sup>7</sup> cells were collected by centrifugation, and the total RNA was extracted by using an RNeasy minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. To avoid genomic DNA contamination, RNA samples were treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) and precipitated in the presence of 3 M LiCl and 20 mM EDTA. For the determination of *hri1*, *hri2*, and *gcn2* mRNA expression, 1  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed in a 20- $\mu$ l reaction mixture by using a reverse transcription (RT) system (Promega) and oligo(dT) primers. The reaction mixture was incubated at 42°C for 15 min, followed by enzyme inactivation at 95°C for 5 min. The LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR green I system (Roche) was used for real-time PCR amplification and quantification using 2  $\mu$ l of first-strand cDNA reaction as a template. The level of actin mRNA in each sample was determined in order to normalize for differences in the total amount of RNA. The data were derived from at least three independent RT reactions, and real-time PCR was performed in duplicate. The data analysis to determine relative *hri1*, *hri2*, and *gcn2* mRNA expression was performed according to the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method (27). Primers were designed to amplify fragments less than 300 bp long in the open reading frame of *hri1* (nucleotides 1026 to 1203), *hri2* (nucleotides 1016 to 1194), *gcn2* (nucleotides 1261 to 11517), and *actin* (nucleotides 169 to 363).

## RESULTS

**Hri1 and Hri2 show both autokinase and eIF2 $\alpha$  kinase activities in vitro and mediate translational control in *S. cerevisiae*.** In the yeast *S. cerevisiae*, phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is carried out only by the Gcn2 protein kinase (18). In *S. pombe*, besides Gcn2, two additional eIF2 $\alpha$  kinases, Hri1 and Hri2, have been characterized, both of which show higher homology with mammalian HRI than with other eIF2 $\alpha$  kinases (53). It should be noted that these two novel eIF2 $\alpha$  kinases lack the two putative heme regulatory motifs (HRMs) present in the mammalian HRI, although they are also sensitive to heme regulation in vitro (17, 53). To further characterize Hri1 and Hri2 as eIF2 $\alpha$  kinases, we expressed them in *Escherichia coli* cells, and the recombinant proteins were affinity purified and subjected to eIF2 $\alpha$  kinase assays as described in Materials and Methods. As a positive control, the reticulocyte heme-reversible HRI (31) was assayed under the same conditions (Fig. 1A, lane 1). Both Hri1 and Hri2 underwent autophosphorylation and were fully active in phosphorylating mammalian eIF2 $\alpha$  (Fig. 1A, lane 2, and Fig. 1B). Moreover, the immunoprecipitated endogenous HA-tagged Hri1 and Hri2 exhibited autokinase activity and phosphorylated mammalian eIF2 $\alpha$  (Fig. 1C, upper panel). These phosphorylated kinases were detected by using immunoblot analysis (Fig. 1C, lower panel). As a negative control, neither wild-type cell extracts immunoprecipitated with anti-HA antibodies nor HA-tagged Hri2 cell extracts immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies showed eIF2 $\alpha$  kinase activity (data not shown). We therefore conclude that endogenous HA-tagged Hri1 and Hri2 show both autokinase and eIF2 $\alpha$  kinase activities in vitro.

It is well known that *S. cerevisiae* is a useful model system for studying the in vivo role of eIF2 $\alpha$  kinases in translational control (11). To address whether Hri1 and Hri2 can functionally replace *S. cerevisiae* GCN2, plasmids encoding kinases or the vector alone were introduced into two isogenic yeast strains lacking the Gcn2 kinase. Yeast cells expressing these *S. pombe* eIF2 $\alpha$  kinases were compared to cells containing plasmid-encoded *S. cerevisiae* GCN2 as a positive control. As expected, all transformants grew to similar levels in synthetic medium (Fig.

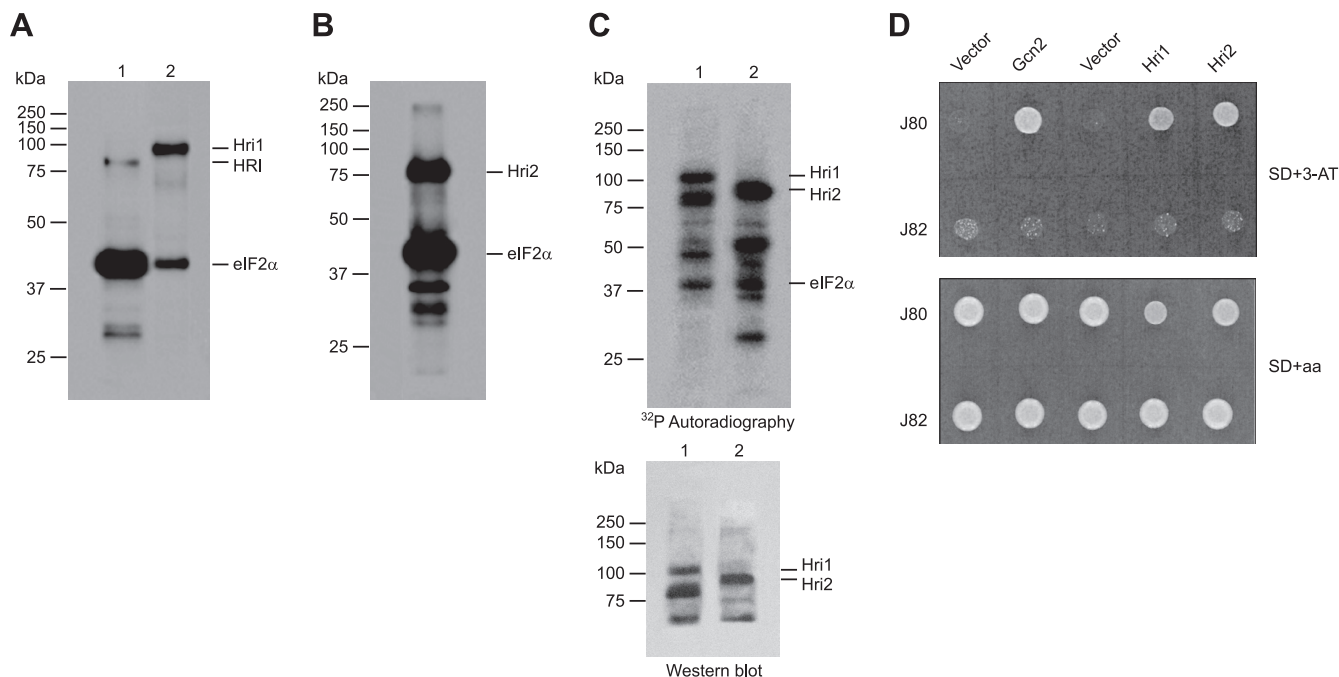


FIG. 1. In vitro and in vivo activity of *S. pombe* eIF2 $\alpha$  kinases Hri1 and Hri2. (A) His-tagged purified Hri1 (lane 2) and purified rabbit HRI (as a control, lane 1) were assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$ , as described in Materials and Methods. Proteins were resolved in SDS-PAGE, and phosphoproteins were visualized by autoradiography of the dried gel. The position of Hri1, HRI, and eIF2 $\alpha$  are indicated on the right, and the positions of molecular weight markers are indicated on the left. (B) His-tagged purified Hri2 was assayed for its ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$  and phosphoproteins were resolved and visualized as described in panel A. The position of Hri2 and eIF2 $\alpha$  are indicated on the right, and positions of molecular weight markers are indicated on the left. (C) Cell extracts from *S. pombe* strains modified to express HA-tagged Hri1 or Hri2 were subjected to immunoprecipitation with anti-HA monoclonal antibody. The immune complexes were assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$ , and proteins were resolved in SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Phosphoproteins were visualized by autoradiography of the dried membrane (upper panel), and HA-tagged proteins were detected by Western blotting with anti-HA antibody (lower panel). The position of HA-tagged Hri1 and Hri2 and eIF2 $\alpha$  are indicated on the right, and positions of molecular weight markers are indicated on the left. (D) J80 and J82 strains of *S. cerevisiae* transformed with empty pEMBLyex4 and pYX212 vectors or with plasmids encoding *S. pombe* Hri1 and Hri2 or *S. cerevisiae* Gcn2 were grown on SD+aa (lower panel) or SD+3-AT (upper panel) plates at 30°C for 3 days. Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

1D, lower panel). Under amino acid starvation produced by supplementing the medium with 3-aminotriazole (3-AT), only the cells expressing an active eIF2 $\alpha$  kinase, either *S. cerevisiae* Gcn2 or both *S. pombe* Hri1 and Hri2, were able to grow. Moreover, the use of strain J82 ( $\Delta$ gcn2 *SUI2-S51A*), isogenic to J80 ( $\Delta$ gcn2), with an alanine substitution for serine 51 in eIF2 $\alpha$ , revealed that phosphorylation of this site was required for the cells to grow in the presence of 3-AT (Fig. 1D, upper panel). Therefore, these *S. pombe* eIF2 $\alpha$  kinases also require the regulatory phosphorylation site in eIF2 $\alpha$  for translational control.

**Gcn2, but not Hri1 or Hri2, is activated early after oxidative stress.** Differential activation of eIF2 $\alpha$  kinases in response to various cellular stresses in *S. pombe* was previously suggested (52). However, this particular work concluded that there was early tandem activation of both Hri2 and Gcn2 after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (52). We wanted to further investigate the contributions of the individual Hri2 and Gcn2 activities during the course of oxidative stress. We observed that the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation increased very rapidly after the exposure of cells to hydrogen peroxide (Fig. 2A). To test whether Hri2 and Gcn2 are both equally implicated in this early response, we next compared the behavior of cells lacking (or not) each of the eIF2 $\alpha$  kinases under oxidative stress. Compared to wild-type

cells, cells devoid of Hri1, Hri2, or both showed a very similar behavior in response to oxidative stress (Fig. 2A). However, deletion of Gcn2 significantly reduced the early activation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation after oxidative stress (Fig. 2A). At longer times, there was an increase of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in cells lacking Gcn2, probably due to the activation of the other eIF2 $\alpha$  kinase. These data demonstrate that soon after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of *S. pombe* cells Gcn2, but not Hri1 or Hri2, is activated, leading to phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

**Sty1 negatively regulates Gcn2 activity during oxidative stress.** A well-studied stress-activated MAPK pathway in *S. pombe* has Sty1 as its central component (32, 45). Sty1 is activated by phosphorylation of two residues: Thr171 and Tyr173 (45). Furthermore, inactivation of Sty1 is carried out by two tyrosine phosphatases, Pyp1 and Pyp2, which directly dephosphorylate Tyr173 of Sty1, both in vivo and in vitro (9, 45). Whereas *pyp1* is constitutively expressed, *pyp2* expression is induced in response to stress by a process that requires the Sty1 kinase (51). To investigate the possible role of the SAPK pathway in modulating eIF2 $\alpha$  kinase activation in response to oxidative stress, further experiments were performed in cells lacking *sty1*, *pyp1*, or the *hri* genes. As shown before, eIF2 $\alpha$  phosphorylation after oxidative stress in the  $\Delta$ *hri1*  $\Delta$ *hri2* mutant was similar to that of wild-type cells (Fig. 2A). However,

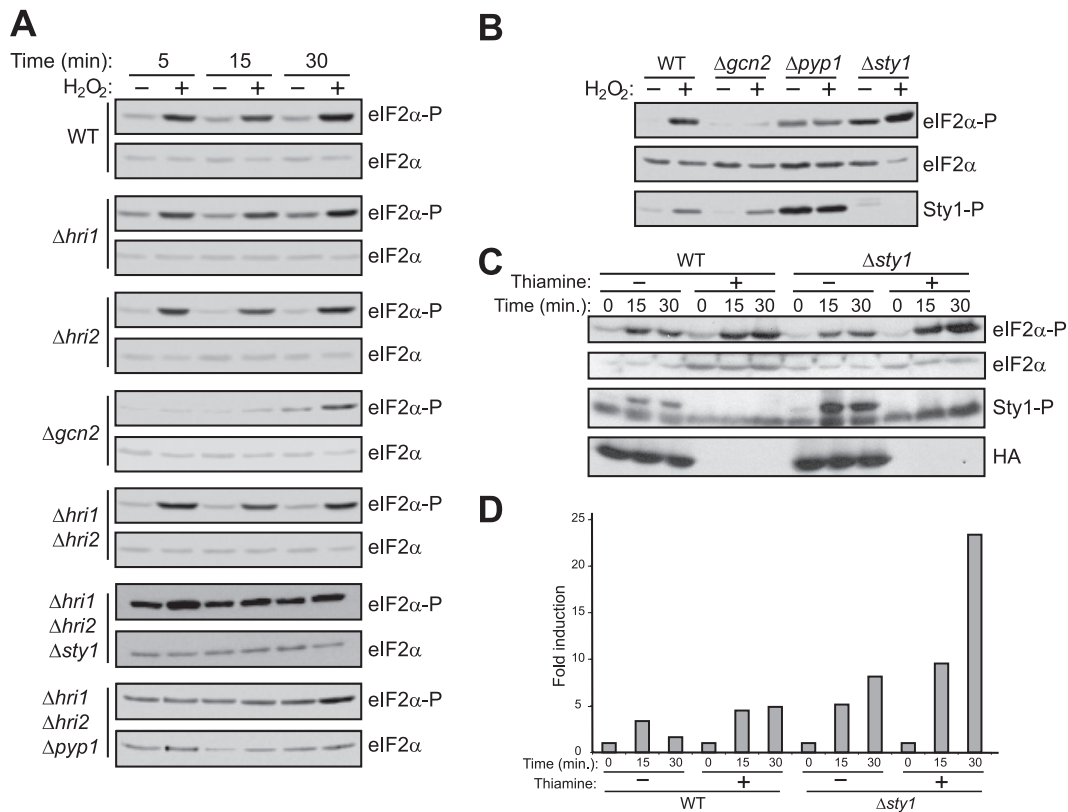


FIG. 2. Effect of oxidative stress on eIF2 $\alpha$  phosphorylation by distinct eIF2 $\alpha$  kinases. Role of the MAPK Sty1. (A and B) Gcn2 is the primary eIF2 $\alpha$  kinase activated in response to oxidative stress; the MAPK Sty1 negatively regulates Gcn2 activity during oxidative stress. (C) Hyperactivation of Sty1 reduces the eIF2 $\alpha$  phosphorylation induced in response to oxidative stress. (D) Quantification of the levels of phosphorylated eIF2 $\alpha$  (ratio eIF2 $\alpha$ -P/eIF2 $\alpha$  referring to untreated cells, whose value was set as 1) in panel C. Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains lacking the different eIF2 $\alpha$  kinases and/or the MAPK Sty1 ( $\Delta$ sty1) and its negative regulator Pyp1 ( $\Delta$ pyp1) were subjected to oxidative stress (1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), as indicated. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and Sty1 were analyzed in the cell extracts by Western blotting with phospho-specific antibodies, as described in Materials and Methods. Shown are the durations of the stress, the names of the strains, and the antibody used for the Western blot (right). In panel B, the length of treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 15 min. In panel C, WT and  $\Delta$ sty1 strains transformed to overexpress a recombinant Sty1-HA-His<sub>6</sub> protein were used; experiments were performed in EMM alone or EMM supplemented with 0.5  $\mu$ M thiamine to repress recombinant protein expression. Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

no significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation occurred in  $\Delta$ hri1  $\Delta$ hri2  $\Delta$ pyp1 cells. Moreover, in  $\Delta$ hri1  $\Delta$ hri2  $\Delta$ sty1 cells, eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels were high in comparison to those of  $\Delta$ hri1  $\Delta$ hri2 cells at all time points examined under stress conditions (Fig. 2A). At early time points, we found no significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in the  $\Delta$ gcn2 mutant after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to that of the wild-type cells; however, the level of Sty1 phosphorylation after oxidative stress was similar to that found in wild-type cells (Fig. 2B). Interestingly, no induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation was observed in the  $\Delta$ pyp1 mutant after exposure to oxidative stress (Fig. 2B). In such a mutant, as expected, markedly increased Sty1 phosphorylation levels were detected even under unstressed conditions (Fig. 2B). In good agreement with these results, the analysis of  $\Delta$ sty1 cells overexpressing Sty1 revealed a significant decrease in eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels compared to those of  $\Delta$ sty1 cells upon oxidative stress (Fig. 2C and D). We conclude that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , at early time points, is dependent on Gcn2 and that Sty1 negatively regulates Gcn2 activity during oxidative stress.

**Role of each eIF2 $\alpha$  kinase and the MAPK Sty1 on eIF2 $\alpha$  phosphorylation and cell viability during oxidative stress.** Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. The activation of the complex MAPK Sty1 pathway is critical for the response to hydrogen peroxide (6). The work of several laboratories has determined that oxidative stress induces a strong activation of the Wis1 MAPK kinase (MEK), which activates Sty1 through Thr171/Tyr173 phosphorylation, resulting in the phosphorylation of its substrates, such as the transcription factor Atf1 (46). Moreover, Sty1 is negatively regulated by two tyrosine phosphatases, Pyp1 and Pyp2. Since the Sty1 pathway is required for induction of Pyp2 mRNA in response to oxidative stress (34), presumably Pyp1 is the major tyrosine phosphatase that dephosphorylates and inactivates Sty1 at early times of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. On the other hand, as shown before (13) and in Fig. 2A, phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is an early response to oxidative stress.

We decided to study which elements of the SAPK and eIF2 $\alpha$  kinase stress pathways are required for the response to hydro-



gen peroxide and for a possible coordination between these two pathways in *S. pombe*, using mutants in different components of the pathways. Thus, to characterize the role of each eIF2 $\alpha$  kinase and of the MAPK Sty1 in response to oxidative stress, we studied different strains, including a wild-type strain, strains devoid of two of the three eIF2 $\alpha$  kinase genes (thereby expressing only Hri1, Hri2, or Gcn2), and the triple mutants in which there were additional disruptions in *sty1* or *pyp1* genes. We examined eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels in response to oxidative stress in both wild-type cells and in mutants in which either the SAPK pathway was disrupted ( $\Delta$ *sty1*) or hyperactivated ( $\Delta$ *pyp1*). As described before, exposure of wild-type cells to 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in enhanced eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels within 5 min. A similar pattern of eIF2 $\alpha$  phosphorylation was detected in the strain containing only Gcn2. However, there was a significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in cells expressing only Hri2 under longer periods of stress treatment. No eIF2 $\alpha$  phosphorylation was detected in the strains expressing only Hri1 (Fig. 3A, left panels). Moreover, in response to hydrogen peroxide, both wild-type cells and mutants showed an increased level of Sty1 phosphorylation within 5 min, which was sustained for at least 60 min (Fig. 3A, left panels). Interestingly, when we eliminated Sty1 in these wild-type and mutant backgrounds, the analysis revealed a marked increase in the eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels in comparison to those of the Sty1-expressing cells, at all time points examined after exposure to oxidative stress. A small increase in eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels was also observed in nonstressed cells (Fig. 3A, middle panels). Moreover, when we eliminated Sty1 in the strain expressing only Hri2, we observed that a significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation took place earlier than it did for Sty1-expressing cells (Fig. 3A, bottom panels). In contrast, eIF2 $\alpha$  phosphorylation was strongly decreased in the *pyp1*-disrupted cells either in the absence or in the presence of oxidative stress (Fig. 3A, right panels). These results indicate that, at early time points, Gcn2 is responsible for the induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation occurring in wild-type cells after exposure to hydrogen peroxide. However, Gcn2 and Hri2 are both implicated in the eIF2 $\alpha$  phosphorylation enhancement in the *sty1*-disrupted cells under conditions of oxidative stress. Our findings suggest a model in which the SAPK pathway functions to negatively regulate both Gcn2 and Hri2, thus maintaining eIF2 activity under conditions of oxidative stress in fission yeast.

We further wanted to investigate whether eIF2 $\alpha$  phosphorylation contributed to the loss of viability observed in *sty1*-disrupted cells when grown under oxidative stress conditions at different doses of the oxidant. As shown previously (6) and in the cell plating assays of Fig. 3B, elimination of the MAPK Sty1 causes sensitivity to hydrogen peroxide. Notably, all *sty1*-disrupted strains were hypersensitive to high (0.75 and 1.5 mM), but not to low (0.2 mM), concentrations of hydrogen peroxide. Previous studies have reported that the MAPK Sty1 pathway is only activated by high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50). However, none of the *sty1*-expressing mutants exhibited any difference in viability compared to wild-type cells, irrespective of the eIF2 $\alpha$  phosphorylation level under these conditions. There was a significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in  $\Delta$ *hri1*  $\Delta$ *hri2* and  $\Delta$ *hri1*  $\Delta$ *gcn2* mutants, whereas eIF2 $\alpha$  phosphorylation was not observed in  $\Delta$ *hri2*  $\Delta$ *gcn2* (Fig. 3A) and  $\Delta$ *hri1*  $\Delta$ *hri2*  $\Delta$ *gcn2*

(not shown) mutants. We conclude that Sty1, but not the eIF2 $\alpha$  kinases, is essential for survival of cells under oxidative stress only at high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sty1 is not required for viability in response to low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

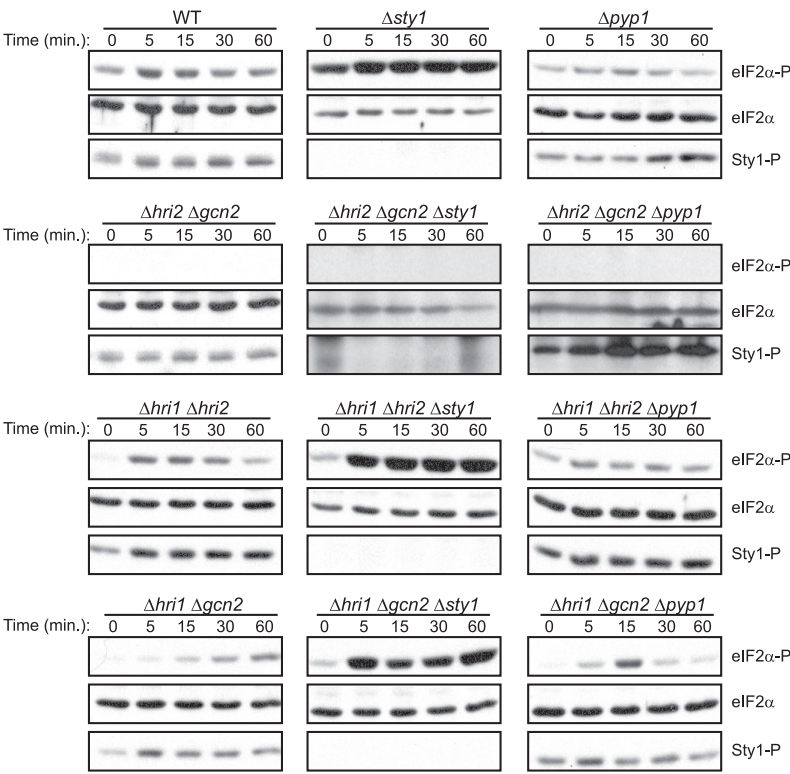
**Role of each eIF2 $\alpha$  kinase and the MAPK Sty1 on eIF2 $\alpha$  phosphorylation and cell viability during exposure to MMS.** Recently, it has been reported that exposure of *S. pombe* cells to the alkylating agent MMS resulted in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in a concentration-dependent manner (25). In order to investigate the contribution of each eIF2 $\alpha$  kinase and the role of the Sty1 in response to genotoxic stress by MMS, wild-type *S. pombe* cells or mutant cells devoid of two of the three eIF2 $\alpha$  kinase genes were subjected to DNA damage-induced stress for different times. As described before, exposure of wild-type cells to 0.02% MMS resulted in enhanced eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels within 15 min (Fig. 4A). As in oxidative stress, Gcn2 is the primary eIF2 $\alpha$  kinase activated in response to MMS, and Hri2 is only activated at longer times of stress treatment. Again, no eIF2 $\alpha$  phosphorylation was detected in the strains expressing only Hri1 (Fig. 4A).

To explore the possible role of Sty1 in modulating eIF2 $\alpha$  kinase activation in response to DNA damage caused by MMS, we performed an experiment by using cells in which *sty1* or *pyp1* was deleted, along with the two *hri* genes. These cells were subjected to oxidative or to DNA damage-induced stresses. Interestingly, while the absence of the MAPK Sty1 markedly increased the levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it had no effect on eIF2 $\alpha$  phosphorylation after MMS treatment (Fig. 4B). Furthermore, by using the  $\Delta$ *sty1* cells overexpressing Sty1, we obtained an increased level of Sty1 phosphorylation in response to hydrogen peroxide, as expected, but not after MMS treatment (Fig. 4C). It had previously been reported that UV irradiation induced activation of Sty1 and that the *sty1* mutant was hypersensitive to this stress (8). Therefore, we performed an additional control experiment by using cells expressing endogenous HA-tagged Sty1 protein (Fig. 4D). We conclude that, in contrast to oxidative stress and UV radiation, the DNA damage caused by MMS activates Gcn2 and Hri2 without the activation of the SAPK pathway.

We showed previously that Sty1, but not the eIF2 $\alpha$  kinases, is essential for survival under oxidative stress. Therefore, we wanted to investigate the effect of Sty1 and the three eIF2 $\alpha$  kinases on cell viability during genotoxic stress. We used the  $\Delta$ *rad3* mutant, which is sensitive to MMS (37), as a control. In this case, we found that, unlike  $\Delta$ *rad3*, the  $\Delta$ *sty1* mutant was not sensitive to the DNA-damaging agent MMS. In fact, all of the mutants exhibited no difference in viability compared to wild-type cells (Fig. 4E). We conclude that, in contrast to oxidative stress, neither Sty1 nor the eIF2 $\alpha$  kinases are essential for survival under MMS-induced DNA damage stress conditions. Moreover, the SAPK pathway does not appear to play any role in regulating the genotoxic stress response caused by MMS in *S. pombe*.

**Hri2, but not Hri1 or GCN2, is activated early after heat shock.** To examine the role of each eIF2 $\alpha$  kinase in response to heat shock at 40°C, wild-type *S. pombe* cells and the mutant strains used in Fig. 4A, grown at 30°C, were exposed to heat shock at 40°C for different periods of time. A marked increase on eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels was observed in wild-type cells within 5 min. However, in contrast to oxidative or geno-

**A**



**B**

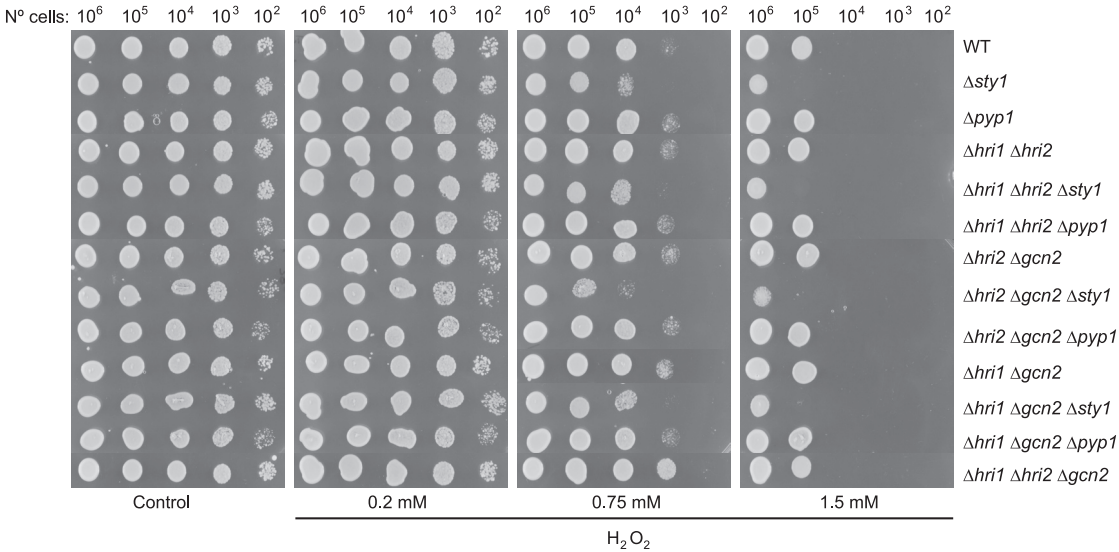


FIG. 3. Effect of the deletion of the different eIF2α kinases and Sty1 on eIF2α phosphorylation and cell viability during oxidative stress. (A) Differential activation of eIF2α kinases in response to oxidative stress. Role of the MAPK Sty1. Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains lacking the different eIF2α kinases and/or the MAPK Sty1 and its negative regulator Pyp1, were subjected to oxidative stress (1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), as indicated. Phosphorylation of eIF2α and Sty1 were analyzed in the cell extracts by Western blotting with phospho-specific antibodies, as described in Materials and Methods. Shown are the length of the stress and the name of the strains (top) and the antibody used for the Western blot (right). (B) Cell viability during oxidative stress in the absence of the eIF2α kinases and/or Sty1. The same cell strains as in panel A were grown on YES-agar plates either containing or not containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2, 0.75 or 1.5 mM, as indicated, and incubated for 48 h at 32°C. Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

toxic stress exposure, a similar pattern of eIF2α phosphorylation was only detected in the strain expressing Hri2, whereas the Gcn2-expressing cells showed a modest effect (Fig. 5A). Therefore, it is clear that Hri2 is the primary eIF2α kinase activated in response to heat shock at 40°C.

It was previously reported that Hri2 is the primary activated eIF2α kinase in response to exposure to heat shock and that Gcn2 has a compensatory role at longer periods of treatment (52). In these experiments, different *S. pombe* strains were exposed to heat shock at 48°C for 10, 20, and 30 min (52). To

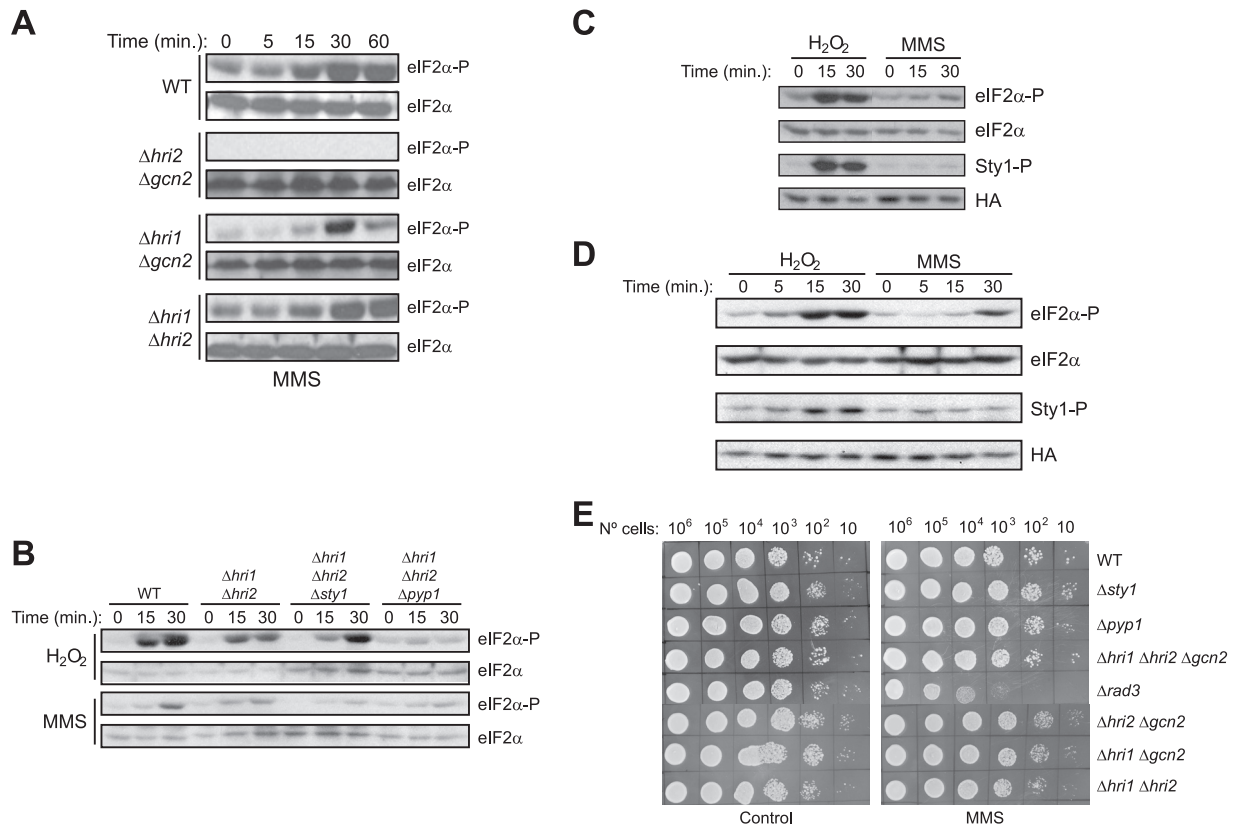


FIG. 4. Effect of the deletion of the different eIF2 $\alpha$  kinases and Sty1 on eIF2 $\alpha$  phosphorylation and cell viability during genotoxic stress by MMS. (A) Differential activation of eIF2 $\alpha$  kinases in response to genotoxic stress by MMS. (B) Gcn2 is the primary eIF2 $\alpha$  kinase activated in response to DNA damage-induced stress caused by MMS, without any effect due to the absence or the overactivation of the MAPK Sty1. (C and D) Sty1 is not activated in response to DNA damage-induced stress caused by MMS. Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains lacking the different eIF2 $\alpha$  kinases and/or the MAPK Sty1 and its negative regulator Pyp1, were subjected to oxidative stress (1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or DNA damage-induced stress (0.02% MMS), as indicated. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and Sty1 were analyzed in the cell extracts by Western blotting with phospho-specific antibodies, as described in Materials and Methods. Shown are the durations of the stress and the names of the strains and the antibody used for the Western blot (right). In panel C, the  $\Delta$ sty1 strain transformed to overexpress a recombinant Sty1-HA-His<sub>6</sub> protein was used; experiments were performed in EMM alone or EMM supplemented with 0.5  $\mu$ M thiamine to repress recombinant protein expression. In panel D, cells expressing endogenous HA-tagged Sty1 protein were used. (E) Cell viability during genotoxic stress in the absence of the eIF2 $\alpha$  kinases and/or Sty1. Cell strains were grown on YES-agar plates either containing or not containing 0.02% MMS, as indicated, and incubated for 48 h at 32°C. Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

further investigate the role of each eIF2 $\alpha$  kinase in response to heat shock at earlier times, we studied mutant strains in which either *hri1* or *hri2* genes or else both were deleted. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in the wild-type cells was significantly enhanced in response to heat shock after 1 min of heat exposure (Fig. 5B). Although  $\Delta$ hri1 cells showed a minimal effect on eIF2 $\alpha$  phosphorylation, deletion of the *hri2* gene reduced the levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in response to heat shock compared to that found in the wild-type cells (Fig. 5B). Interestingly, at early times, these reduced levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation were in fact much lower than those found in the corresponding unstressed cells (Fig. 5B), suggesting the activation of an eIF2 $\alpha$  phosphatase very early during heat treatment. It is well known that protein serine/threonine phosphatases type I and 2A promote the dephosphorylation of mammalian eIF2 $\alpha$  in vitro (35). Two PP1-related genes (*dis2* and *sds21*) and two PP2A-related genes (*ppa1* and *ppa2*) are present in fission yeast (24). To test the possible effect of these phosphatases on the  $\Delta$ hri2 mutant in response to heat shock, we analyzed strains

in which the *hri2*<sup>+</sup> gene was deleted in combination with one of these phosphatases. Although deletion of either *dis2* (Fig. 5C) or *sds21* (data not shown) had no effect on eIF2 $\alpha$  phosphorylation, the deletion of *ppa2* markedly increased the levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in response to heat exposure compared to that found in  $\Delta$ hri2 cells (Fig. 5C). Since the  $\Delta$ hri2  $\Delta$ ppa2 mutant still contains the other PP2A-related gene *ppa1*, we repeated the experiment in the presence of okadaic acid (Fig. 5D), a highly effective inhibitor for mammalian type 2A phosphatases. In this case, the recovery of eIF2 $\alpha$  phosphorylation observed after heat shock was fully dependent on type 2A-like protein phosphatase inhibition. All of these data indicate that Hri2, but not Gcn2, and the type 2A protein phosphatases are activated early during the heat shock exposure at 48°C.

**Role of each eIF2 $\alpha$  kinase and Sty1 on eIF2 $\alpha$  phosphorylation and cell viability during heat shock.** In heat-shocked cells, Pyp1 is inhibited for its interaction with Sty1, which leads to strong activation of Sty1. Subsequently, Sty1 activity is rapidly attenuated by Thr171 dephosphorylation, whereas Tyr173 re-

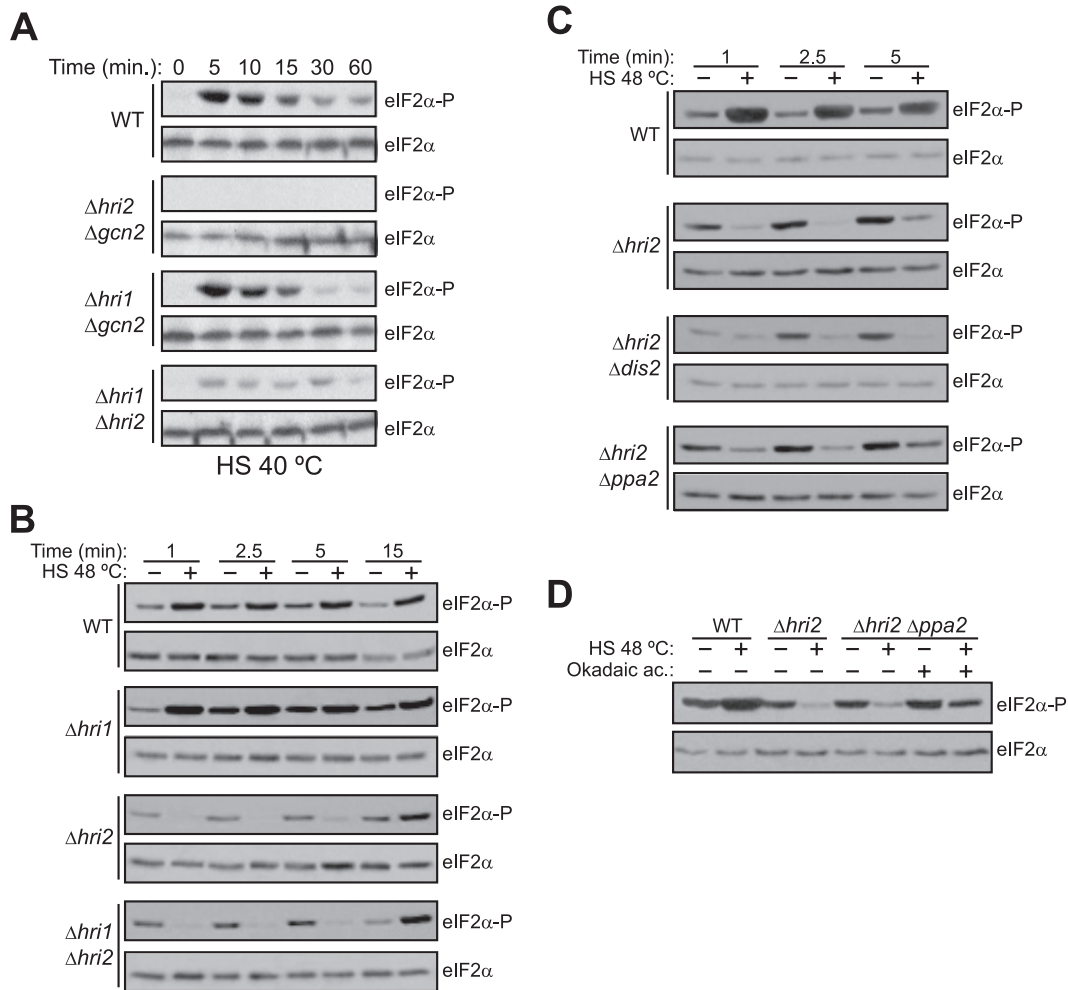


FIG. 5. Effect of heat shock on eIF2 $\alpha$  phosphorylation by distinct eIF2 $\alpha$  kinases. Role of the activation of the type 2A protein phosphatases in the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . (A and B) Hri2 is the primary eIF2 $\alpha$  kinase activated in response to heat shock at 40 and 48°C. (C and D) The type 2A protein phosphatases are activated during heat shock at 48°C and dephosphorylate eIF2 $\alpha$ . Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains lacking the different eIF2 $\alpha$  kinases and/or the protein phosphatases 1-1 (*dis2*) and 2A (*ppa2*) were subjected to heat shock (48°C), as indicated. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was analyzed in the cell extracts by Western blotting with a phospho-specific antibody, as described in Materials and Methods. Shown are the durations of the stress (in minutes), the names of the strains, and the antibody used for the Western blot (right). In panel D, the length of stress was 5 min; also indicated is the name of the strain and the pretreatment with okadaic acid (top) and the antibody used for the Western blot (right). Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

mains phosphorylated. Previous *in vivo* and *in vitro* data strongly suggested that PP2C enzymes Ptc1 and Ptc3 dephosphorylate Sty1 Thr171 (34). On the other hand, a differential activation of eIF2 $\alpha$  kinases in response to heat shock in *S. pombe* was reported earlier (16). To further characterize the roles of each eIF2 $\alpha$  kinase and of the MAPK Sty1 in the high level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation observed early during heat stress (Fig. 5B), the strain collection was next exposed to heat shock at 48°C for 5, 10, or 15 min. As shown before, after 5 min of heat shock the strain expressing only Hri2 exhibited levels of phosphorylated eIF2 $\alpha$  similar to those of the wild-type cells (Fig. 6A). At this time, no eIF2 $\alpha$  phosphorylation was detected in the strains expressing only Hri1 or Gcn2 (Fig. 6A) or the mutant cells devoid of all three eIF2 $\alpha$  kinases (not shown). At 15 min after the heat shock, significant levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation were observed in cells expressing only Gcn2. Interestingly, there were modest amounts of eIF2 $\alpha$  phosphorylation

in cells expressing either Hri1 or Gcn2 under unstressed conditions, but the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation was significantly reduced just after 5 min of heat shock (Fig. 6A, long exposure). The observed early activation of PP2A during the heat shock exposure (Fig. 5C) may explain this effect.

On the other hand, in good agreement with a previous report (34), only transient induction of the catalytic activity of Sty1 was observed in response to heat shock. Thus, the peak of Sty1 phosphorylation observed 5 min after the heat shock decreased rapidly at subsequent time points (Fig. 6A), which correlates with the reported kinetics of Sty1 activation after heat shock (34). Interestingly, all of the *sty1*-disrupted strains exhibited no difference in the eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels in comparison to those of the Sty1-expressing cells at all time points examined after exposure to heat shock (Fig. 6A, middle panels). All of these results indicate that Hri2, but not Gcn2, is responsible for the induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation which



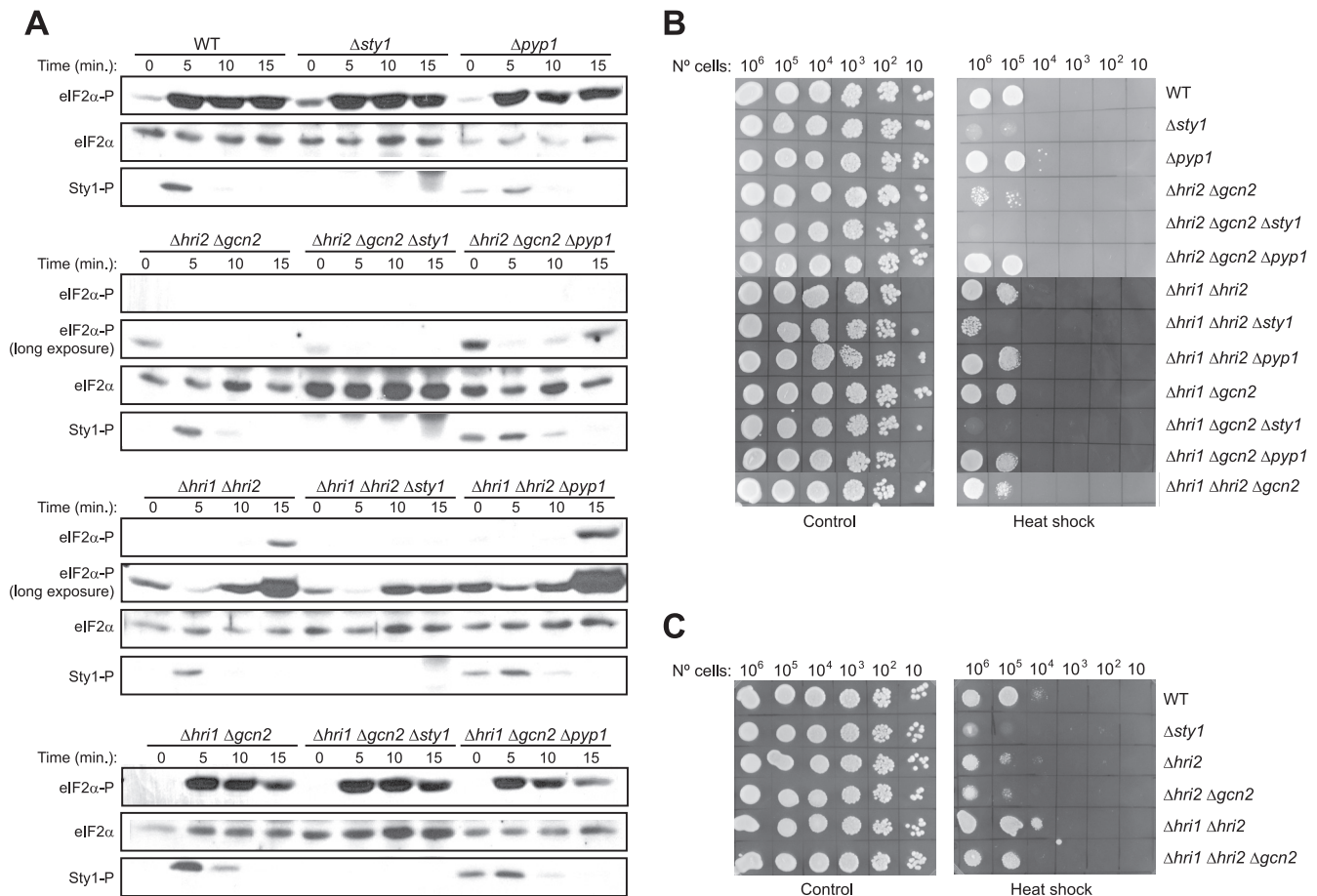


FIG. 6. Effect of the deletion of the different eIF2 $\alpha$  kinases and Sty1 on eIF2 $\alpha$  phosphorylation and cell viability during heat shock. (A) Differential activation of eIF2 $\alpha$  kinases in response to heat shock. Role of the MAPK Sty1. Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains lacking the different eIF2 $\alpha$  kinases and/or the MAPK Sty1 and its negative regulator Pyp1 were subjected to heat shock (48°C), as indicated. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and Sty1 were analyzed in the cell extracts by Western blotting with phospho-specific antibodies, as described in Materials and Methods. Shown are the durations of the stress, the names of the strains (top), and the antibody used for the Western blot (right). (B and C) Cell viability during heat shock in the absence of the eIF2 $\alpha$  kinases and/or Sty1. The same cell strains as in panel A plus a strain lacking the *hri2* gene ( $\Delta hri2$ ) were grown on YES-agar plates; for the heat shock, plates were incubated at 40°C for 24 h and then incubated for 48 additional hours at 32°C. Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

occurred following exposure to heat shock. Moreover, Sty1 is activated soon after heat shock, but in this case does not regulate the eIF2 $\alpha$  kinase activity.

To test whether Sty1 and the eIF2 $\alpha$  kinases are both required for stress survival, we compared the phenotypes of cells lacking (or not) each kinase under heat stress conditions. As previously reported with the hydrogen peroxide treatment, Sty1, but not the eIF2 $\alpha$  kinases, is essential to survive heat stress. Thus, whereas all cells lacking Sty1 showed severely impaired survival, the inactivation of all three eIF2 $\alpha$  kinases completely eliminates eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and yet these cells showed an intermediate behavior, with survival efficiencies closer to those of the wild-type rather than the  $\Delta sty1$  cells (Fig. 6B). Surprisingly, a  $\Delta hri2 \Delta gcn2$  strain was markedly more sensitive to heat shock than wild-type cells but not nearly as sensitive as  $\Delta sty1$  mutants. Moreover, when Pyp1 was further eliminated in this mutant, the resistance to heat shock was restored (Fig. 6B). In addition, the same behavior was observed particularly with the  $\Delta hri2$  strain (Fig. 6C). These re-

sults support the notion that in the *S. pombe* strains containing Hri1, the presence of Hri2 is essential for cell survival under heat stress conditions. We do not yet know the molecular mechanism.

**Regulation of the eIF2 $\alpha$  kinase gene expression during oxidative stress and heat shock.** We next examined whether the induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation observed in response to oxidative stress and heat shock is accompanied by changes at the level of transcription and translation of the distinct eIF2 $\alpha$  kinases in *S. pombe*. To assess whether the response to these stress conditions is coordinated in terms of transcriptional and translational levels, further experiments were performed using wild-type *S. pombe* cells or cells of strains expressing the different HA-tagged eIF2 $\alpha$  kinases. We studied the expression of the distinct mRNAs by using quantitative real-time RT-PCR, and we analyzed the protein levels in the cell extracts by Western blotting with anti-HA antibodies. As shown in Fig. 7, the expression of the *hri2* and *gcn2* genes was induced at the transcriptional level (1.5- to 3-fold) by 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 7A),



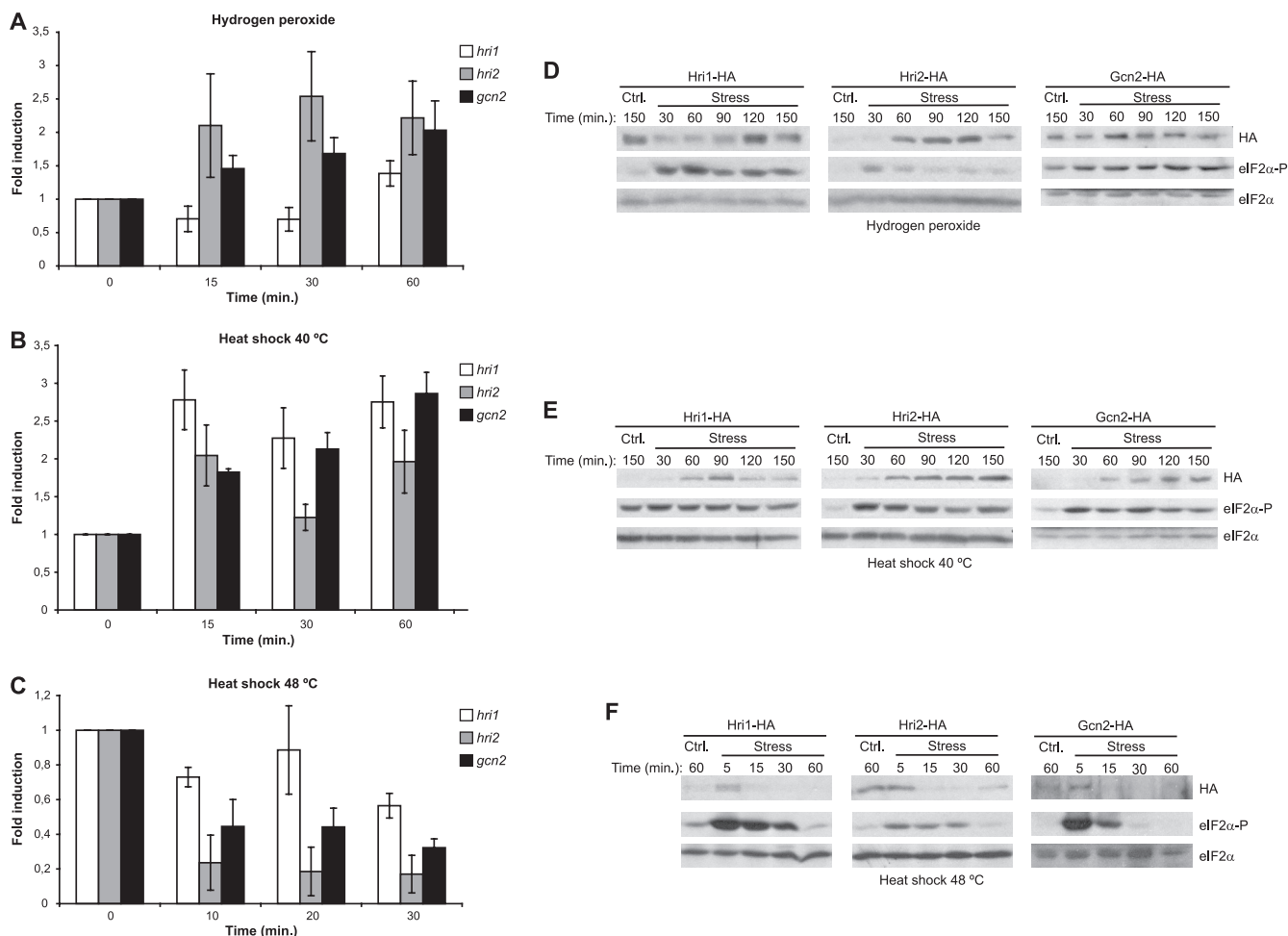


FIG. 7. Changes in mRNA and protein levels of the distinct eIF2 $\alpha$  kinases in response to oxidative stress and heat shock. (A, B, and C) Levels of *hri1*, *hri2*, and *gcn2* mRNAs increase after oxidative stress and 40°C heat shock, but decrease after 48°C heat shock. (D, E, and F) Levels of Hri1, Hri2, and Gcn2 proteins increase after oxidative stress and 40°C heat shock but decrease after 48°C heat shock. Wild-type (WT) *S. pombe* cells or cells of strains expressing the different HA-tagged eIF2 $\alpha$  kinases were subjected to oxidative stress (1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or heat shock (40 and 48°C). The levels of the distinct mRNAs were quantified by quantitative real-time RT-PCR, as described in Materials and Methods. Values show the fold induction compared to untreated control cells, whose level of mRNA was set as 1. The results show the means of three to five independent experiments plus the standard deviations. HA-tagged proteins levels and phosphorylation of eIF2 $\alpha$  were analyzed in the cell extracts by Western blotting with anti-HA or phospho-specific antibodies, as described in Materials and Methods. Shown are the durations of the stress (minutes) and the names of the antibody used for the Western blot (right). Shown are the results of representative experiments of at least three independent experiments with similar results.

as well as after heat shock treatment at 40°C (Fig. 7B). In contrast, a significant decrease in transcript levels of *hri2* and *gcn2* mRNAs was observed after heat shock exposure at 48°C (0.2- to 0.4-fold compared to that of unstressed cells) (Fig. 7C). It is of interest that the expression of *hri1* was moderately downregulated in response to hydrogen peroxide at early time points, and it was strongly upregulated after heat shock treatment at 40°C, but it showed little change in gene expression after heat shock treatment at 48°C (Fig. 7A to C). Interestingly, the changes in protein levels of the distinct eIF2 $\alpha$  kinases were coordinated with the mRNA levels shown for each stress condition. Thus, mRNAs that were transcriptionally upregulated also changed in protein production with similar values (a 1.5- to 4-fold increase) (Fig. 7D and E). Moreover, mRNAs that were transcriptionally downregulated also changed in the protein levels accordingly (0.15- to 0.4-fold compared to that of unstressed cells)

(Fig. 7F). We conclude that a significant correlation exists between changes in mRNA and protein levels of the distinct eIF2 $\alpha$  kinases in *S. pombe* in response to oxidative stress and heat shock and that the significant induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation observed in response to each stress condition represents an early event that is not related to these changes in gene expression.

## DISCUSSION

The results presented here provide important insights into the translational responses of fission yeast to oxidative stress and heat shock. After exposure to both stresses, elevated levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation were rapidly observed. Our results fully agree with previous reports concluding that both Gcn2 and Hri2 are mainly involved in these responses (13, 52). However, in contrast to these findings, we found important differ-

ences between these two eIF2 $\alpha$  kinases. Thus, Gcn2, but not Hri2, is activated early in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and conversely, Hri2, but not Gcn2, is stimulated early under exposure to high temperatures. The apparent discrepancy between our data and previous results is that previous experiments were performed for longer periods of exposure to stress. Indeed, our studies also demonstrate that the levels of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in the cells that only express Hri2 or Gcn2 were significantly elevated after longer exposures to oxidative stress or heat shock, respectively.

It is well known that eIF2 $\alpha$  phosphorylation can promote changes in gene expression through preferential translation of stress response genes. Thus, in *S. cerevisiae*, Gcn4, a transcriptional activator of genes involved in the biosynthesis of amino acids, was found to be translationally induced by stress signals such as amino acid or glucose deprivation, allowing the transcriptional activation of stress response mRNAs (18, 19). In mammalian cells, under stress, the eIF2 $\alpha$  kinases stimulate translation of ATF4, which activates the transcription of CHOP, a downstream target that is itself a transcription factor that controls expression of a set of stress-induced target genes (15). Such conservation of translational control of transcriptional regulators from yeast to mammals suggests that a related transcriptional activator is also controlled by eIF2 $\alpha$  kinases in *S. pombe*. However, a Gcn4 ortholog is not present in *S. pombe*, despite the conservation of this transcriptional activator among a range of fungi, including *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans*, and *Aspergillus nidulans* (21, 36, 49). Since both *GCN4* and *ATF4* mRNAs are preferentially translated in response to phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by a mechanism involving upstream open reading frames (uORFs) (15, 19), we have used the presence of these uORFs as a query to search for related transcriptional activators in *S. pombe* by using the *S. pombe* Genome Project. During the course of our analysis of the *S. pombe* genome, we found various putative candidates. Nevertheless, the identification of potential regulatory targets for eIF2 $\alpha$  phosphorylation by the eIF2 $\alpha$  kinases in *S. pombe* awaits further biochemical studies.

Studies performed over the last few years have highlighted the importance of a SAPK pathway in regulating a variety of stress responses in *S. pombe*. Activation of Sty1 is required for the transcription of genes involved in stress responses. In *S. pombe*, the transcriptional response to oxidative stress elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mediated by at least two transcription factors, Pap1 and Atf1. Pap1 is important for the response to low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas Atf1 is more important for the response to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50). Heat shock-induced activation of Sty1 is regulated via inhibition of the Pyp1 tyrosine phosphatase, which dephosphorylates and inactivates Sty1 (34). Previous findings, together with some data of our study, suggest a possible relationship between SAPK and eIF2 $\alpha$  kinase stress pathways. Our results demonstrate for the first time that the MAPK Sty1 negatively regulates Gcn2 and Hri2 kinases under conditions of oxidative stress, but not upon heat shock, in fission yeast. Interestingly, in response to heat shock, a functional type 2A serine/threonine phosphatase was found to maintain eIF2 $\alpha$  activity. The overall conclusion from these studies is that the responses to heat shock and hydrogen peroxide are quite different, with distinct requirements for signaling but quite similar ones for survival. Thus, our studies confirm that the pres-

ence of Sty1 is essential for cell survival in both heat shock and hydrogen peroxide stresses. In contrast, the absence of all three eIF2 $\alpha$  kinases leads to very similar viabilities of *S. pombe* cells compared to wild-type cells under both types of stress. Interestingly, both  $\Delta hri2$  and  $\Delta hri2 \Delta gcn2$  mutants display an unexpected behavior upon exposure to high temperatures. Thus, when exposed to heat shock, these cells are more sensitive than  $\Delta hri1 \Delta hri2 \Delta gcn2$  cells, indicating that Hri1 could function as a negative factor in the response to high temperatures. Note that its survival was reproducibly restored when Sty1 activity was increased in the  $\Delta hri2 \Delta gcn2 \Delta pyp1$  mutant (Fig. 6B). Most important, our data strongly suggest that the presence of Hri2 is essential for cell survival under heat stress conditions for the *S. pombe* strains containing Hri1. The mechanistic insights of such an observation remain to be clarified.

To our surprise, Sty1 does not play any role in response to the genotoxic stress induced by MMS in *S. pombe*. Thus, exposure to MMS induces Gcn2-dependent phosphorylation of eIF2 $\alpha$  but does not affect Sty1 phosphorylation. Moreover, Sty1 is not essential for survival under exposure to MMS. Therefore, we believe that the regulatory coordination between the SAPK and eIF2 $\alpha$  kinase pathways is a stress-specific phenomenon.

Previous studies, using microarray analysis, explored the transcriptional responses of *S. pombe* to various environmental stresses, including oxidative stress caused by hydrogen peroxide and heat shock caused by temperature increase to 39°C (5). Thus, a core environmental stress response (CESR) common to all, or most, stresses was defined. The CESR genes were controlled primarily by Sty1 and the transcription factor Atf1 (5). Further investigations by the same researchers into gene expression responses to different doses of hydrogen peroxide provided an overview of genes with changes in transcriptional levels. Some genes were induced, whereas another cluster of genes was specifically repressed in a dose-dependent manner (6). On the other hand, earlier analysis did not reveal any strong correlation between changes in transcript level and the translational response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (43). Here, we found important differences in the gene expression response of the fission yeast eIF2 $\alpha$  kinases to different environmental stresses. Thus, both *hri2* and *gcn2* genes were induced, whereas the *hri1* gene was repressed in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Our results demonstrate for the first time that the eIF2 $\alpha$  kinase genes were repressed by heat shock caused by a temperature increase to 48°C and that the *hri2* transcript appears to be preferentially degraded. Interestingly, our results reveal a coregulation at the transcription and translation levels in all of the stress conditions studied. Our data further indicate that the stimulation of a particular eIF2 $\alpha$  kinase activity observed in response to each stress condition is unrelated with these changes in gene expression.

Taken together, these results indicate that hydrogen peroxide and heat shock have different effects on fission yeast physiology, even though some of their effects seem to be similar (e.g.,  $\Delta sty1$  mutant sensitivities). On the other hand, it seems that the transcriptional program displayed to respond to different types of stress requires several transcription factors from the SAPK and eIF2 $\alpha$  kinase pathways, with a different degree of importance and functional dependence for each type of stress. The requirement for the eIF2 $\alpha$  kinases is apparent early

during adaptive conditions, when it is needed to inhibit translation initiation and to induce the expression of unknown target genes in response to both types of stress in actively growing cells. Our current studies are focused on identifying these regulatory genes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mónica Elías for useful experimental work during the initial stage of this study. We thank Elena Hidalgo (University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain), Isabel Álvarez (Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, United Kingdom), and Antony Carr (University of Sussex, Sussex, United Kingdom) for providing reagents and fission yeast strains. We also thank José Alcalde, Carlos Chillón, and Ana Elisa Rozalén for excellent technical assistance.

This study was supported in part by grants BMC2002-03933, BFU2005-07627, and BFU2007-62987 from the DGICYT (to C.D.H.), BFU2008-01808 (to S.M.), and an institutional grant from the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. J.J.B. is a researcher of the Ramón y Cajal Program of the Ministry of Science and Innovation of Spain.

#### REFERENCES

- Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie III, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**:943–951.
- Berlanga, J. J., S. Herrero, and C. de Haro. 1998. Characterization of the heme-sensitive eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase from mouse nonerythroid cells. *J. Biol. Chem.* **273**:32340–32346.
- Berlanga, J. J., J. Santoyo, and C. De Haro. 1999. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur. J. Biochem.* **265**:754–762.
- Berlanga, J. J., I. Ventoso, H. P. Harding, J. Deng, D. Ron, N. Sonenberg, L. Carrasco, and C. de Haro. 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* **25**:1730–1740.
- Chen, D., W. M. Toone, J. Mata, R. Lyne, G. Burns, K. Kivinen, A. Brazma, N. Jones, and J. Bahler. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**:214–229.
- Chen, D., C. R. Wilkinson, S. Watt, C. J. Penkett, W. M. Toone, N. Jones, and J. Bahler. 2008. Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**:308–317.
- de Haro, C., R. Mendez, and J. Santoyo. 1996. The eIF-2 $\alpha$  kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* **10**:1378–1387.
- Degols, G., and P. Russell. 1997. Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **17**:3356–3363.
- Degols, G., K. Shiozaki, and P. Russell. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2870–2877.
- Deng, J., H. P. Harding, B. Raught, A. C. Gingras, J. J. Berlanga, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ron, and N. Sonenberg. 2002. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr. Biol.* **12**:1279–1286.
- Dever, T. E. 1997. Using GCN4 as a reporter of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and translational regulation in yeast. *Methods* **11**:403–417.
- Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**:545–556.
- Dunand-Sauthier, I., C. A. Walker, J. Narasimhan, A. K. Pearce, R. C. Wek, and T. C. Humphrey. 2005. Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryot. Cell* **4**:1785–1793.
- Gietz, R. D., and R. A. Woods. 2001. Genetic transformation of yeast. *Bio-techniques* **30**:816–828.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**:1099–1108.
- Harding, H. P., Y. Zhang, and D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**:271–274.
- Herrero, S., J. J. Berlanga, I. Alonso, and C. de Haro. 2006. Heme responsiveness in vitro is a common feature shared by the eukaryotic factor 2 $\alpha$  kinase family. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **72**:611–627.
- Hinnebusch, A. G. 1997. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**:21661–21664.
- Hinnebusch, A. G. 2000. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosome, p. 185–243. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hinnebusch, A. G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:407–450.
- Hoffmann, B., O. Valerius, M. Andermann, and G. H. Braus. 2001. Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **12**:2846–2857.
- Ikner, A., and K. Shiozaki. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* **569**:13–27.
- Kaufman, R. J. 2000. The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR, p. 503–527. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kinoshita, N., H. Yamano, H. Niwa, T. Yoshida, and M. Yanagida. 1993. Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev.* **7**:1059–1071.
- Krohn, M., H. C. Skjölberg, H. Soltani, B. Grallert, and E. Boye. 2008. The G<sub>1</sub>-S checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint. *J. Cell Sci.* **121**:4047–4054.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method. *Methods* **25**:402–408.
- Lu, L., A. P. Han, and J. J. Chen. 2001. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7971–7980.
- Mascarenhas, C., L. C. Edwards-Ingram, L. Zeef, D. Shenton, M. P. Ashe, and C. M. Grant. 2008. Gcn4 is required for the response to peroxide stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **19**:2995–3007.
- Mendez, R., and C. de Haro. 1994. Casein kinase II is implicated in the regulation of heme-controlled translational inhibitor of reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* **269**:6170–6176.
- Mendez, R., A. Moreno, and C. de Haro. 1992. Regulation of heme-controlled eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2 $\alpha$ -subunit kinase of reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* **267**:11500–11507.
- Millar, J. B., V. Buck, and M. G. Wilkinson. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* **9**:2117–2130.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**:795–823.
- Nguyen, A. N., and K. Shiozaki. 1999. Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* **13**:1653–1663.
- Novoa, I., H. Zeng, H. P. Harding, and D. Ron. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J. Cell Biol.* **153**:1011–1022.
- Paluh, J. L., M. J. Orbach, T. L. Legerton, and C. Yanofsky. 1988. The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-Jun-encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:3728–3732.
- Perez-Hidalgo, L., S. Moreno, and P. A. San-Segundo. 2008. The fission yeast meiotic checkpoint kinase Mek1 regulates nuclear localization of Cdc25 by phosphorylation. *Cell Cycle* **7**:3720–3730.
- Preiss, T., J. Baron-Benhamou, W. Ansoorge, and M. W. Hentze. 2003. Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat. Struct. Biol.* **10**:1039–1047.
- Proud, C. G. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**:3–12.
- Rodríguez-Gabriel, M. A., and P. Russell. 2005. Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **4**:1396–1402.
- Sanso, M., M. Gogol, J. Ayte, C. Seidel, and E. Hidalgo. 2008. Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot. Cell* **7**:826–835.
- Santoyo, J., J. Alcalde, R. Mendez, D. Pulido, and C. de Haro. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2 $\alpha$  (eIF-2 $\alpha$ ) kinase from *Drosophila melanogaster*: homology to yeast GCN2 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:12544–12550.
- Shenton, D., J. B. Smirnova, J. N. Selley, K. Carroll, S. J. Hubbard, G. D. Pavitt, M. P. Ashe, and C. M. Grant. 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**:29011–29021.
- Shi, Y., K. M. Vattam, R. Sood, J. An, J. Liang, L. Stramm, and R. C. Wek. 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell. Biol.* **18**:7499–7509.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1995. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**:739–743.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic

- stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* **10**:2276–2288.
47. Smirnova, J. B., J. N. Selley, F. Sanchez-Cabo, K. Carroll, A. A. Eddy, J. E. McCarthy, S. J. Hubbard, G. D. Pavitt, C. M. Grant, and M. P. Ashe. 2005. Global gene expression profiling reveals widespread yet distinctive translational responses to different eukaryotic translation initiation factor 2B-targeting stress pathways. *Mol. Cell. Biol.* **25**:9340–9349.
  48. Takeda, T., T. Toda, K. Kominami, A. Kohnosu, M. Yanagida, and N. Jones. 1995. *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J.* **14**:6193–6208.
  49. Tripathi, G., C. Wiltshire, S. Macaskill, H. Tournu, S. Budge, and A. J. Brown. 2002. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J.* **21**:5448–5456.
  50. Vivancos, A. P., M. Jara, A. Zuin, M. Sanso, and E. Hidalgo. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genomics* **276**:495–502.
  51. Wilkinson, M. G., M. Samuels, T. Takeda, W. M. Toone, J. C. Shieh, T. Toda, J. B. Millar, and N. Jones. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* **10**:2289–2301.
  52. Zhan, K., J. Narasimhan, and R. C. Wek. 2004. Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **168**:1867–1875.
  53. Zhan, K., K. M. Vattam, B. N. Bauer, T. E. Dever, J. J. Chen, and R. C. Wek. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol. Cell. Biol.* **22**:7134–7146.